

VISIT...

LANZAROTE  
*Caliente*.COM

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, выпуск 1, 2000

|                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Биохимия рака<br>Г.И. Абелев, Б.П. Копнин                                                                                                                          | 3   |
| Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза (обзор)<br>Б.П. Копнин                                       | 5   |
| Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью (обзор)<br>П.М. Чумаков                                                                                             | 34  |
| Супрессия p53: новый подход к преодолению побочных эффектов противоопухолевой терапии (обзор)<br>Е.А. Комарова, А.В. Гудков                                        | 48  |
| Киназы семейства Src: структура и функции (обзор)<br>А.Г. Татосян, О.А. Мизенина                                                                                   | 57  |
| Сигнальные пути, регулируемые фосфатидилинозит-3-киназой и их значение для роста, выживаемости и злокачественной трансформации клеток (обзор)<br>М.А. Красильников | 68  |
| Вирус-ассоциированные опухоли человека: рак шейки матки и вирусы папиллом (обзор)<br>Ф.Л. Киселев                                                                  | 79  |
| Естественный отбор и ранние изменения фенотипа опухолевых клеток <i>in vivo</i> : приобретение новых механизмов защиты (обзор)<br>Г.И. Дейчман                     | 92  |
| Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток (обзор)<br>А.А. Ставровская                                                         | 112 |
| Механизмы дифференцировки и опухолевый рост (обзор)<br>Г.И. Абелев                                                                                                 | 127 |
| Молекулярные механизмы регуляции экспрессии гена альфа-фетопroteина (обзор)<br>Н.Л. Лазаревич                                                                      | 139 |
| <b>ХРОНИКА</b>                                                                                                                                                     |     |
| Знаменательные и юбилейные даты истории биохимии 2000 года<br>Н.П. Воскресенская, Е.Н. Былинский                                                                   | 159 |

просы освещаются в представленных статьях в контексте фундаментальных исследований.

Статьи номера расположены несколькими блоками: онкогены и гены-супрессоры, сигнальные пути, опосредующие их действие, – в обзорах Б.П. Копнина, П.М. Чумакова, Е.А. Комаровой и А.В. Гудкова, А.Г. Татосяна, О.А. Мизениной и М.А. Красильникова. Механизмы вирусного канцерогенеза рассмотрены на модели вирусов папилломы Ф.Л. Киселевым. Пути естественной эволюции опухолей обсуждены в обзоре Г.И. Дейчман, а механизмы лекарственной

устойчивости и эволюции опухоли в условиях химиотерапии – А.А. Ставровской. Наконец, особая проблема – дифференцировка в опухолях, ее связь с трансформацией и роль в диагностике и терапии опухолей – представлены в обзорах Г.И. Абелева и Н.Л. Лазаревич.

Мы надеемся, что материалы этого номера, дающего взгляд на жгучую научную и практическую проблему из «первых рук», послужат стимулом для привлечения в эту область интересов молекулярных исследователей и научной молодежи.

Г.И. Абелев  
Б.П. Копнин

УДК 576.385.5

## МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ ОНКОГЕНОВ И ОПУХОЛЕВЫХ СУПРЕССОРОВ: КЛЮЧ К ПОНИМАНИЮ БАЗОВЫХ МЕХАНИЗМОВ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

### Обзор

© 2000 г. Б.П. Корнин

Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина  
РАМН, 115478 Москва, Каширское ш., 24; факс: (095)324-1739,  
электронная почта: korpin@itnb.ac.ru

Поступила в редакцию 17.09.99

Ключевую роль в онкогенезе играют изменения определенных генов, так называемых «протоонкогенов» и «опухолевых супрессоров». Дисфункция кодируемых ими белков приводит к нарушениям регуляции сигнальных путей, контролирующих клеточный цикл, апоптоз, генетическую стабильность, дифференцировку и морфогенетические реакции клетки. Очевидно, что нарушения именно этих важнейших физиологических процессов ответственны не только за начальные этапы неопластической трансформации клетки, но и предопределяют дальнейшую опухолевую прогрессию, приводящую к развитию злокачественных новообразований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** онкоген, опухолевый супрессор, апоптоз, генетическая стабильность, дифференцировка.

Значительный прогресс в понимании механизмов канцерогенеза связан с открытием сначала онкогенов и протоонкогенов, а затем – опухолевых супрессоров и мутаторных генов. Онкогены – это клеточные или вирусные (вносимые вирусом в клетку) гены, экспрессия которых может привести к развитию новообразования. Протоонкогены – нормальные клеточные гены, усиление или модификация функции которых превращает их в онкогены. Опухолевые супрессоры (антионкогены, рецессивные опухолевые гены) – клеточные гены, инактивация которых резко увеличивает вероятность возникновения новообразований, а восстановление функции, наоборот, может подавить рост опухолевых клеток. Следует заметить, что причисляемые к опухолевым супрессорам так называемые «мутаторные» гены, т.е. гены, нарушение функции которых тем или иным способом увеличивает темп возникновения мутаций и/или других генетических изменений, могут и не влиять на рост неопластических клеток. Однако их инактивация столь сильно увеличивает вероятность появления различных онкогенных мутаций, что образование опухоли становится лишь делом времени.

Принадлежность к онкогенам или опухолевым супрессорам определяется несколькими критериями: а) закономерным характером изменений структуры и/или экспрессии данного гена

в клетках определенных или различных новообразований; б) возникновением в юном или молодом возрасте определенных форм опухолей у индивидов с передающимися по наследству герминальными (т.е. произошедшими в половой клетке) мутациями данного гена; в) резким повышением частоты появления опухолей у трансгенных животных, либо экспрессирующих активированную форму данного гена – в случае онкогенов, либо несущих инактивирующие мутации («нокаут») данного гена – в случае опухолевых супрессоров; г) способностью вызывать в культивируемых *in vitro* клетках морфологическую трансформацию и/или неограниченный рост (онкогены), либо подавление клеточного роста и/или выраженности признаков трансформации (опухолевые супрессоры).

Два последних десятилетия характеризовались бурным открытием все новых и новых онкогенов и опухолевых супрессоров. К настоящему времени известно около сотни потенциальных онкогенов (клеточных и вирусных) и около двух десятков опухолевых супрессоров. Были описаны генетические события, приводящие к активации протоонкогенов или инактивации опухолевых супрессоров [1–6]. Обнаружено, что механизм действия вирусных онкогенов связан с активацией клеточных протоонкогенов (ретровирусы) или инактивацией опухолевых супрессоров (ДНК-содержащие вирусы) [7–11]. Выяв-



лены характерные для тех или иных форм новообразований человека изменения онкогенов и опухолевых супрессоров, в том числе высокоспецифичные аномалии, используемые для постановки диагноза [3, 12] (табл. 1, 2).

Однако долгое время знания о каждом из онкогенов или опухолевых супрессоров представлялись дискретными, в значительной мере не связанными между собой. И лишь в самые последние годы стала вырисовываться общая картина, показывающая, что подавляющее большинство известных протоонкогенов и опухолевых супрессоров являются компонентами нескольких общих сигнальных путей, контролирующих клеточный цикл, апоптоз, целостность генома, морфогенетические реакции и дифференцировку клеток. Очевидно, изменения именно в этих сигнальных путях в конце концов и приводят к развитию злокачественных новообразований. Ниже приведены сведения об основных мишенях действия онкогенов и опухолевых супрессоров.

## 1. ОНКОГЕНЫ И ОПУХОЛЕВЫЕ СУПРЕССОРЫ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

В основе образования опухоли лежит избыточное размножение определенных клеток. Совершенно естественно поэтому, что нарушения регуляции клеточного цикла являются неотъемлемым и основополагающим признаком неопластической клетки. «Мотором» клеточного цикла, как известно, служат активности последовательно сменяющих друг друга циклинзависимых киназ [16] (рис. 1). Каждая циклинзависимая киназа (Cdk) представляет собой каталитическую субъединицу холоферментного комплекса, для активности которой требуется присутствие активаторной субъединицы – циклина. Регуляция активности Cdk осуществляется за счет направленного изменения уровня определенных циклинов в определенные фазы клеточного цикла. Кроме того, активность Cdk регулируется изменениями фосфорилирования их определенных аминокислотных остатков. В активной форме комплексы циклин–Cdk фосфорилируют регуляторные белки, контролирующие протекание данной фазы.

Оказалось, что действие многих протоонкогенов и опухолевых супрессоров направлено на регуляцию тех или иных комплексов циклин–Cdk. Белковые продукты большинства из них повышают активность циклинзависимых киназ, ответственных за начальные этапы пресинтетической фазы G1 (комплексы циклинов D1–D3 с Cdk4 или Cdk6 в зависимости от типа клеток) и

переход из G1 в S-фазу синтеза ДНК (циклин E–Cdk2) (рис. 1). Кроме того, некоторые протоонкогены и опухолевые супрессоры регулируют активность комплексов циклин A–Cdk2 (требуется для репликации ДНК) и циклин B–Cdk1 (другое название Cdk1–Cdc2, необходим для перехода из G2 в митоз).

Основным субстратом комплексов циклин D–Cdk4 и циклин D–Cdk6 являются опухолевый супрессор pRb и Rb-подобные белки p105 и p130. pRb и его гомологи дефосфорилированы в неделящихся клетках и в пролиферирующих клетках, находящихся в ранней G1-фазе [17]. В таком состоянии они связывают и блокируют транскрипционные комплексы E2F–DP (E2F-1, -2, -3, -4, -5 и DP-1, -2, -3), регулирующие активность ряда генов, продукты которых необходимы для начала и прохождения S-фазы. В частности, E2F–DP регулируют экспрессию генов тими-динкиназы, дигидрофолатредуктазы, циклина E, циклина A, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), ДНК-полимеразы  $\alpha$  и др. [18]. Связывание белков семейства E2F с pRb ингибирует их транскрипционную активность. При митогенных сигналах, вызываемых ростовыми факторами, pRb в середине G1-фазы фосфорилиру-

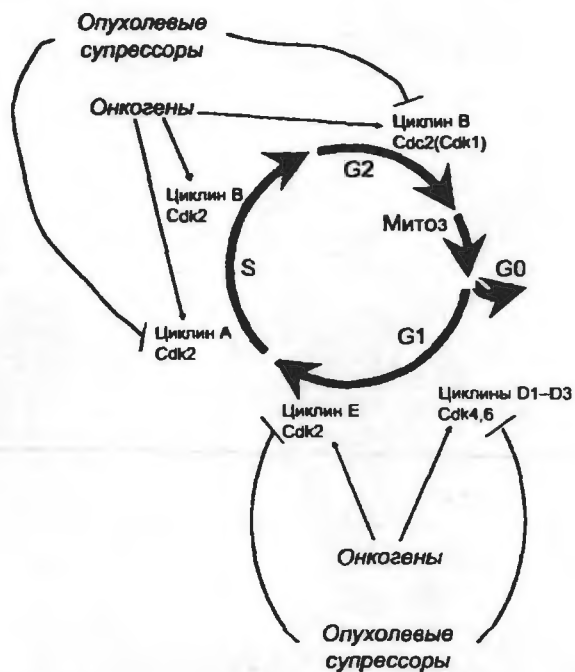


Рис. 1. Движение по клеточному циклу определяется последовательной активацией различных комплексов циклин–Cdk. Большинство из них – мишени активирующего действия онкогенов или ингибирующего действия опухолевых супрессоров

Таблица 1. Некоторые изменения протоонкогенов, характерные для новообразований человека

| Протоонкоген               | Функция белка                                                                                                                          | Изменения                                                                                                                                                                               | Новообразования*                                                                                                                    |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>RET (GDNF-R)</i>        | рецепторная тирозинкиназа                                                                                                              | а) точечные активирующие мутации;<br>б) рекомбинации, образующие химерные гены <i>Ret/ptc</i> , кодирующие постоянно активированный рецептор                                            | <u>синдромы множественных эндокринных неоплазий (MEN2a, MEN2b),</u> <u>медуллярный*</u> и <u>папиллярный раки щитовидной железы</u> |
| <i>ERBB1 (EGF-R)</i>       | рецепторная тирозинкиназа                                                                                                              | амплификация и гиперэкспрессия гена                                                                                                                                                     | глиобластомы и другие нейрогенные опухоли                                                                                           |
| <i>ERBB2 (HER2)</i>        | рецепторная тирозинкиназа                                                                                                              | амплификация и/или гиперэкспрессия гена                                                                                                                                                 | рак молочной железы                                                                                                                 |
| <i>PDGF-Rβ</i>             | рецепторная тирозинкиназа                                                                                                              | хромосомные транслокации, образующие химерные гены <i>TEL/PDGF-Rβ</i> , <i>CVE6/PDGF-Rβ</i> , кодирующие постоянно активированные рецепторы                                             | хронический миеломоноцитарный лейкоз, острый миелобластный лейкоз                                                                   |
| <i>SRC</i>                 | нерецепторная тирозинкиназа                                                                                                            | мутации в кодоне 531, отменяющие негативную регуляцию киназной активности                                                                                                               | часть опухолей толстого кишечника на поздних стадиях                                                                                |
| <i>K-RAS, N-RAS, H-RAS</i> | участвует в передаче митогенных сигналов и регуляции морфогенетических реакций                                                         | мутации в кодонах 12,13,61, вызывающие образование постоянно активированной GTP-связанной формы Ras                                                                                     | 60–80% случаев рака поджелудочной железы; 25–30% различных солидных опухолей и лейкозов                                             |
| <i>PRAD1/циклин D1</i>     | регулирует клеточный цикл                                                                                                              | амплификация и/или гиперэкспрессия гена                                                                                                                                                 | рак молочной и слюнных желез                                                                                                        |
| <i>C-MYC</i>               | фактор транскрипции, регулирует клеточный цикл и активность теломеразы                                                                 | а) хромосомные транслокации, перемещающие ген под контроль регуляторных элементов генов иммуноглобулинов;<br>б) амплификация и/или гиперэкспрессия гена; мутации, стабилизирующие белок | а) лимфома Бэркита<br><br>б) многие формы новообразований                                                                           |
| <i>CTNNB1 (β-катенин)</i>  | а) транскрипционный фактор, регулирует c-MYC и циклин D1;<br>б) связываясь с кадхерином, участвует в образовании адгезионных контактов | мутации, увеличивающие количество несвязанного с E-кадхерином β-катенина, который функционирует как транскрипционный фактор                                                             | <u>наследственный аденоматозный полипоз толстой кишки;</u> различные формы спорадических опухолей                                   |
| <i>BCL2</i>                | подавляет апоптоз, регулируя проницаемость митохондриальных и ядерных мембран                                                          | хромосомные транслокации, перемещающие ген под контроль регуляторных элементов генов иммуноглобулинов                                                                                   | фолликулярная лимфома                                                                                                               |
| <i>ABL</i>                 | регулирует клеточный цикл и апоптоз                                                                                                    | хромосомные транслокации, ведущие к образованию химерных генов <i>BCR/ABL</i> , продукты которых стимулируют пролиферацию клеток и подавляют апоптоз                                    | все хронические миелоидные лейкозы, часть острых лимфобластных лейкозов                                                             |
| <i>MDM2</i>                | инактивирует опухолевые супрессоры p53 и pRb                                                                                           | амплификация и/или гиперэкспрессия гена                                                                                                                                                 | часть остеосарком и сарком мягких тканей                                                                                            |

\* Подчеркнуты наследственные формы заболеваний, возникающие при мутациях в половых клетках. В остальных случаях мутации происходят в соматических клетках, которые образуют опухоли.

Таблица 2. Формы опухолей человека, возникающие при инактивации некоторых опухолевых супрессоров и мутаторных генов

| Ген                           | Функция белка                                                                                                                                                          | Новообразования*                                                                                       |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>p53</i>                    | транскрипционный фактор; регулирует клеточный цикл и апоптоз, контролирует целостность генома                                                                          | <u>синдром Ли-Фраумени</u> и большинство форм спорадических опухолей                                   |
| <i>INK4a/ARF</i>              | ингибирование Cdk4**, активация p53**                                                                                                                                  | <u>наследственные меланомы</u> и многие спорадические опухоли                                          |
| <i>Rb</i>                     | контролирует вход в S-фазу, регулируя активность фактора транскрипции E2F                                                                                              | <u>наследственные ретинобластомы</u> и многие формы спорадических опухолей                             |
| <i>TbR-II</i>                 | рецептор второго типа для цитокина TGF-β                                                                                                                               | <u>наследственные и спорадические раки толстой кишки</u>                                               |
| <i>SMAD2, SMAD3</i>           | передают сигнал от активированных рецепторов TGF-β к Smad4                                                                                                             | рак толстой кишки, легкого, поджелудочной железы                                                       |
| <i>SMAD4/DPC4</i>             | транскрипционный фактор; опосредует действие цитокина TGF-β, приводящее к активации ингибиторов Cdk – p21 <sup>WAF1</sup> , p27 <sup>KIP1</sup> , p15 <sup>INK4a</sup> | <u>ювенильный гамартоматозный полипоз желудка и кишечника</u> ; различные формы спорадических опухолей |
| <i>E-Кадгерин</i>             | участвует в межклеточных взаимодействиях; инициирует передачу сигналов, активирующих p53, p27 <sup>KIP1</sup>                                                          | <u>наследственные раки желудка</u> и многие формы спорадических опухолей                               |
| <i>APC</i>                    | связывает и разрушает цитоплазматический β-катенин, препятствует образованию транскрипционных комплексов β-катенин/Tcf                                                 | <u>наследственный аденоматозный полипоз</u> и спорадические опухоли толстой кишки                      |
| <i>VHL</i>                    | подавляет экспрессию гена VEGF (фактора роста эндотелия сосудов) и других генов, активируемых при гипоксии                                                             | <u>синдром фон Хиппеля-Линдау (множественные гемангиомы)</u> ; светлоклеточные карциномы почки         |
| <i>WT1</i>                    | транскрипционный фактор; связываясь с p53, модулирует экспрессию p53-реактивных генов                                                                                  | <u>наследственные нефробластомы (опухоль Вилмса)</u>                                                   |
| <i>PTEN/MMAC1</i>             | фосфатаза; стимулирует апоптоз, подавляя активность PI3K-PKB/Akt сигнального пути                                                                                      | <u>болезнь Коудена (множественные гамартомы)</u> ; многие спорадические опухоли                        |
| <i>NF1 (нейрофибромин)</i>    | белок семейства GAP; переводит онкоген <i>ras</i> из активной в неактивную форму                                                                                       | <u>нейрофиброматоз первого типа</u>                                                                    |
| <i>NF2 (мерлин)</i>           | участвует во взаимодействиях мембраны с цитоскелетом                                                                                                                   | <u>нейрофиброматоз второго типа</u> ; спорадические менингиомы, мезотелиомы и др. опухоли              |
| <i>BRCA1</i>                  | повышает активность p53 и других факторов транскрипции, связываясь с RAD51 участвует в узнавании и/или репарации повреждений ДНК                                       | <u>наследственные опухоли молочной железы и яичников</u> ; различные формы спорадических опухолей      |
| <i>BRCA2</i>                  | транскрипционный фактор с активностью гистоновой ацетилтрансферазы; связываясь с RAD51, участвует в репарации ДНК                                                      | <u>наследственные опухоли молочной железы и яичников</u> ; различные формы спорадических опухолей      |
| <i>MSH2, MLH1, PMS1, PMS2</i> | репарация неспаренных участков ДНК (mismatch repair)                                                                                                                   | <u>неполипозный рак толстой кишки и яичников</u> ; многие спорадические опухоли                        |

\* Подчеркнуты наследственные формы заболеваний, возникающие при мутациях в половых клетках.

\*\* Локус *INK4a/ARF* кодирует два белка: p16<sup>INK4a</sup> – ингибитор циклинзависимых киназ Cdk4,6 и p19<sup>ARF</sup> (Alternative Reading Frame) – продукт альтернативной рамки считывания, который, связывая p53 и Mdm2, блокирует их взаимодействие и препятствует деградации p53 [13, 14]. Делеции и многие точечные мутации в локусе *INK4a/ARF* вызывают одновременно инактивацию супрессорных активностей обоих этих белков [15].

ется комплексом циклин D-Cdk4 (или циклин D-Cdk6), что вызывает высвобождение транскрипционных факторов E2F-DP из комплекса с pRb и их активацию [17]. Одним из следствий этого является стимуляция транскрипции гена циклина E, в результате чего активируются комплексы циклин E-Cdk2, также фосфорилирующие pRb. Таким образом, возникает регуляторная петля, поддерживающая активность транскрипционных факторов E2F-DP и контролируемых ими генов, обеспечивающих репликацию ДНК (см. рис. 2). После завершения S-фазы pRb переходит в дефосфорилированное состояние, в котором он блокирует активность E2F-DP и вход

в следующую S-фазу (для ее инициации необходим новый митогенный стимул, активирующий комплексы циклин D-Cdk4,6). Таким образом, опухолевый супрессор pRb играет ключевую роль в регуляции вхождения клетки в S-фазу.

Продукты многих протоонкогенов являются компонентами сигнальных путей, ответственных за активацию комплексов циклин D-Cdk4,6 и циклин E-Cdk2 в ответ на действие ростовых факторов и/или адгезию клеток к белкам внеклеточного матрикса (рис. 2). Так, связывание рецепторов ростовых факторов со своими лигандами индуцирует димеризацию и аутофосфорилирование рецепторов (одна субъединица

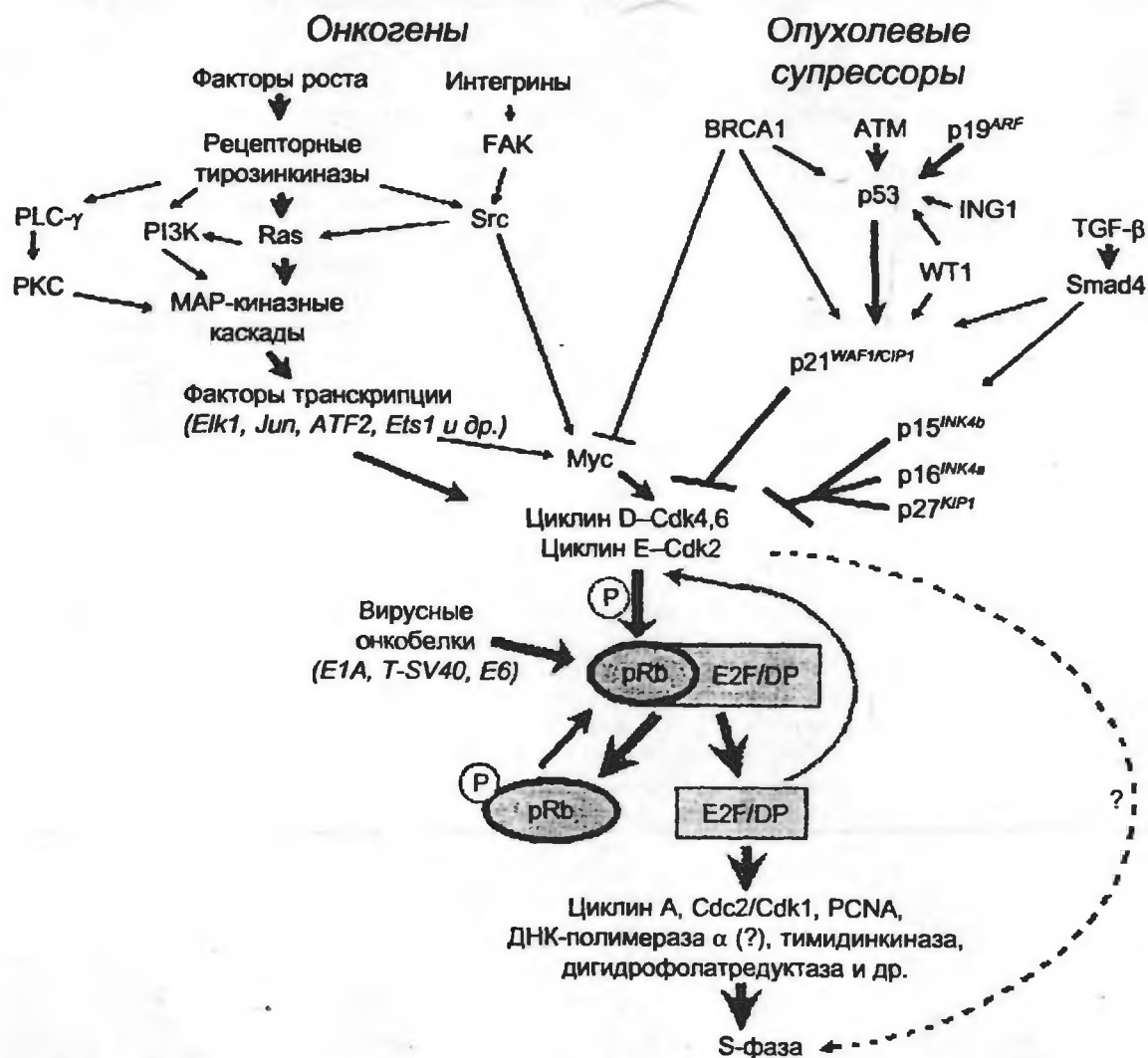


Рис. 2. Продукты многих протоонкогенов и опухолевых супрессоров регулируют активность циклинзависимых киназ, фосфорилирующих pRb. Фосфорилирование pRb, как и его связывание с рядом вирусных онкобелков, вызывает высвобождение и активацию транскрипционных комплексов E2F-DP, повышающих экспрессию генов, продукты которых необходимы для прохождения S-фазы

димера фосфорилирует другую по тирозинам). Это, в свою очередь, вызывает взаимодействие рецепторных тирозинкиназ со многими сигнальными белками, содержащими SH2-домены и связывающими фосфотирозин. Например, активированные рецепторы фактора роста из тромбоцитов (PDGF-R $\beta$ ) взаимодействуют с SH2-доменами таких белков, как фосфатидилинозит-3'-киназа (PI3K) (см. статью М.А. Красильникова в этом же номере журнала), фосфолипаза C (PLC)- $\gamma$ 1, латентные формы транскрипционных факторов STAT и адаптерный белок Grb2, передающий сигнал к белкам Ras [19–21]. Связывание каждого из этих белков с фосфотирозинами рецептора вызывает активацию перекрестных сигнальных путей, завершающуюся активацией в ядре набора транскрипционных факторов и экспрессией специфических генов (рис. 2). В частности, индуцируемый Grb2 переход белков Ras в активированное (GTP-связанное) состояние ведет к стимуляции ряда его эффекторов, в том числе серин-треониновых киназ Raf\* и MEKK, запускающих MAP- (Mitogen Activated Protein) киназные каскады [20, 22]. Конечные продукты этих каскадов, ERK (MAPK), p38 и JNK (SAPK), транслоцируются из цитоплазмы в ядро, где они фосфорилируют и активируют множество субстратов, в том числе такие транскрипционные факторы, как Elk1, Ets1\*, Ets2\*, Jun\*, ATF2, Tcf и др. Это, в свою очередь, вызывает активацию ряда других факторов транскрипции. Так, Elk1, формируя комплекс с SRF (Serum Response Factor), инициирует транскрипцию генов, содержащих в своем промоторе SRE-элементы, например гена *FOS*\*.

Сходные реакции наблюдаются и при связывании интегринов (рецепторов, опосредующих адгезию клетки) с белками внеклеточного матрикса. Такое взаимодействие вызывает активацию и аутофосфорилирование киназы FAK (Focal Adhesion Kinase), в результате чего она связывается с SH2-доменом протоонкобелка Src, что, в свою очередь, вызывает рекрутирование адаптерного белка Grb2, активацию Ras и MAP киназных каскадов (рис. 2) (подробнее – см. статью А.Г. Татосяна и О.А. Мизениной в этом же номере журнала).

Следствием изменений активности ряда транскрипционных факторов, индуцируемых активацией MAP-киназ, является повышение

экспрессии гена циклина D1 (предполагается, что за это ответственны белки Jun, Ets1, Ets2 [21]). Кроме того, митогенные сигналы повышают экспрессию Мус, что также вызывает увеличение активности циклинзависимых киназ, оперирующих в G1 (циклин D-Cdk4 и циклин E-Cdk2). Это связано с тем, что Мус, во-первых, трансктивирует ген *Cdc25a*-фосфатазы, снимающей ингибиторное фосфорилирование Cdk2 и Cdk4 по Thr-14 и Tyr-15, а во-вторых, понижает экспрессию ингибитора Cdk2, p27<sup>KIP1</sup> [23–26]. Механизмы активации Мус при действии ростовых факторов изучены пока плохо. Предполагается, что к ней могут приводить как Ras-независимые сигнальные пути, активируемые онкобелком Src, так и Ras-Raf-MAP-киназные каскады, вызывающие активацию Ets1 и/или E2F (промотор гена *MYC* содержит респонсивные элементы для этих транскрипционных факторов [22, 26]).

Многие участники сигнальных путей, опосредующих в ответ на действие ростовых факторов активацию циклинзависимых киназ и, следовательно, стимуляцию клеточного деления, являются протоонкогенами. Изменения их структуры (мутации), приводящие к ускользанию от воздействия негативных регуляторных факторов и/или перманентному повышению экспрессии, превращают такие протоонкогены в онкогены [1, 3, 5]. Продукты идентифицированных онкогенов представляют все уровни регуляции митогенного сигнала [5]: ростовые факторы – PDGF- $\beta$  (Sis), FGF1 и др.; рецепторные тирозинкиназы – EGF-R (ErbB), HGF-R (Met), Ret и др.; белки семейства Ras – K-Ras, H-Ras и N-Ras; эффекторы Ras – серин-треониновые киназы Raf и Mos; транскрипционные факторы – Jun, Ets1, Мус и др.; и, наконец, циклин D1 (Prad1). Складывается впечатление, что при детальном анализе в каждом новообразовании выявляются изменения хотя бы одного из компонентов сигнальных путей (протоонкогенов), вызывающие перманентную стимуляцию активности циклинзависимых киназ и инициацию клеточного деления вне зависимости от действия ростовых факторов.

Интересно, что сигнальный путь Cdk-Rb-E2F контролируется не только pRB, но и многими другими супрессорными белками (рис. 2). Некоторые из них являются ингибиторными субъединицами Cdk (CKIs – Cdk Inhibitors), опосредующими остановку клеточного цикла в ответ на различные внеклеточные и внутриклеточные сигналы [16]. Идентифицированы два семейства CKIs: Ink4 и Cip/Kip. Первое включает четыре представителя, в том числе опухолевые супрессоры p15<sup>INK4b</sup> и p16<sup>INK4a</sup>. Белки Ink4 обладают

\* Здесь и далее для обозначения протоонкогенов и их белковых продуктов используются общепринятые в настоящее время принципы: гены обозначаются курсивом (в случае генов человека все буквы заглавные, для генов животных все буквы строчные), а их белковые продукты – с заглавной буквы обычным шрифтом.



достаточно узкой специфичностью: связывая Cdk4 и Cdk6, они препятствуют образованию их комплексов с циклинами D [16, 27]. Семейство Cip/Kip состоит из трех членов: p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> и p57<sup>KIP2</sup>. Эти белки связывают и ингибируют уже полностью сформированные комплексы циклин D–Cdk4,6, циклин E–Cdk2 и циклин A–Cdk2. Кроме того, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> способен блокировать и комплекс циклин B–Cdc2, ответственный за продвижение по G2-фазе и вход в митоз [16, 27]. И p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, и p27<sup>KIP1</sup> опосредуют влияние других супрессорных белков. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> является одной из основных мишеней трансаktивационного действия p53, а следовательно, и супрессоров, участвующих в регуляции стабильности/активности p53 (p19<sup>ARF</sup>, ATM, WT1 [13, 14, 28, 29] (см. статью П.М. Чумакова в этом же номере журнала) или его транскрипционной активности (BRCA1 и p33<sup>ING1</sup> [30–32]). (BRCA1 и WT1 способны активировать p21<sup>WAF1/CIP1</sup> также и по неизвестным пока p53-независимым механизмам [31, 33].)

Наряду с p15<sup>INK4b</sup> p27<sup>KIP1</sup> является ключевым компонентом передачи ингибиторных сигналов, индуцируемых связыванием TGF-β со своими рецепторами (рис. 2). Недавно обнаружено, что активированные рецепторы TGF-β фосфорилируют специфические сигнальные эффекторы, белки Smad2 и Smad3, вызывая их связывание с опухолевым супрессором Smad4. Образующиеся комплексы транслицируются из цитоплазмы в ядро, где они регулируют транскрипцию специфических генов, в частности ингибиторов Cdk. В результате активируются и p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, и p15<sup>INK4b</sup> [34–37]. Последний вытесняет p27<sup>KIP1</sup> из комплекса с Cdk4/6 и подавляет образование их комплексов с циклинами D, необходимых для продвижения по G1 (рис. 1). Высвобожденный p27<sup>KIP1</sup>, в свою очередь, связывает и ингибирует комплексы циклин E–Cdk2, ответственные за начало S-фазы. Повышение экспрессии p21<sup>WAF1/CIP1</sup> также ведет к подавлению активности комплексов циклин D–Cdk4,6 и циклин E–Cdk2. В результате клетка останавливается в G0/G1 и не входит в S-фазу (рис. 3).

Ингибирующий эффект TGF-β преодолевается гиперэкспрессией онкогенов MYC или MDM2 [38]. И если действие Myc связано с активацией различных Cdk путем повышения экспрессии Cdc25A [23] и стимуляции деградации p27<sup>KIP1</sup> [24], то белок Mdm2 помимо деградации p53 [13, 14] вызывает и инактивацию pRb [39], высвобождая таким образом активные транскрипционные комплексы E2F–DP. Следовательно, и гиперэкспрессия протоонкогенов MYC или MDM2, и инактивирующие мутации в опухолевых супрессорах Smad4, p15<sup>INK4b</sup>, pRb име-

ют одно общее последствие – клетки ускользают от ингибирующего действия TGF-β, что представляется очень важным для развития эпителиальных опухолей, в частности раков кишечника и поджелудочной железы [40, 41].

Одним из наиболее ярких достижений двух последних лет явилась идентификация еще одного важнейшего сигнального пути, очень часто нарушающегося в различных новообразованиях человека и осуществляющего, вероятно, регуляцию клеточного цикла в зависимости от состояния мембранных и подмембранных структур клетки [42] (см. рис. 4). Оказалось, что в несвязанном с E-кадхерином состоянии β-катенин может функционировать как фактор транскрипции. В цитоплазме он связывается с другим транскрипционным фактором Tcf4, после чего комплексы β-катенин–Tcf4 транслицируются в ядро и активируют гены, имеющие в своем составе специфические респонсивные элементы. Одними из основных мишеней трансаktивационного действия комплекса β-катенин–Tcf4 являются гены циклина D1 [43] и MYC [44]. Опухолевый супрессор APC, врожденные мутации которого вызывают развитие аденоматозного полипоза кишечника, связывает свободный цитоплазматический β-катенин, что вызывает деградацию последнего [45, 46]. Таким образом, инактивация APC, стимулируя образование комплексов β-катенин–Tcf4, повышает транскрипцию генов циклина D1, MYC и, как следствие, ведет к активации циклинзависимых киназ, ответственных за продвижение по G1 и вход в S-фазу (рис. 4). К таким же последствиям приводят и мутации β-катенина, увеличивающие стабильность его в цитоплазме (такие мутации обнаруживаются у пациентов с семейным полипозом, не имеющих мутаций APC [43, 47]; большинство из них поражает сайты β-катенина, фосфорилируемые киназой-3β гликогенсинтазы, GSK-3β). Сходная картина наблюдается также и при активации протоонкогена WNT1 (Wingless/INT1) (рис. 4). Связывание его продукта Wnt1 (член семейства цистеин-богатых гликозилированных сигнальных протеинов) со своим рецептором (Frizzled) вызывает перемещение цитоплазматического белка Dsh к мембране, где он ингибирует киназную активность GSK-3β, которая, фосфорилируя β-катенин и APC, стимулирует их связывание и деградацию β-катенина. Таким образом, индуцируемое Wnt1 подавление активности GSK-3β приводит к стабилизации и повышению внутриклеточной концентрации цитоплазматического β-катенина, что повышает вероятность образования активных транскрипционных комплексов β-катенина с факторами семейства Tcf/Lef1 [48]. Не исключено,

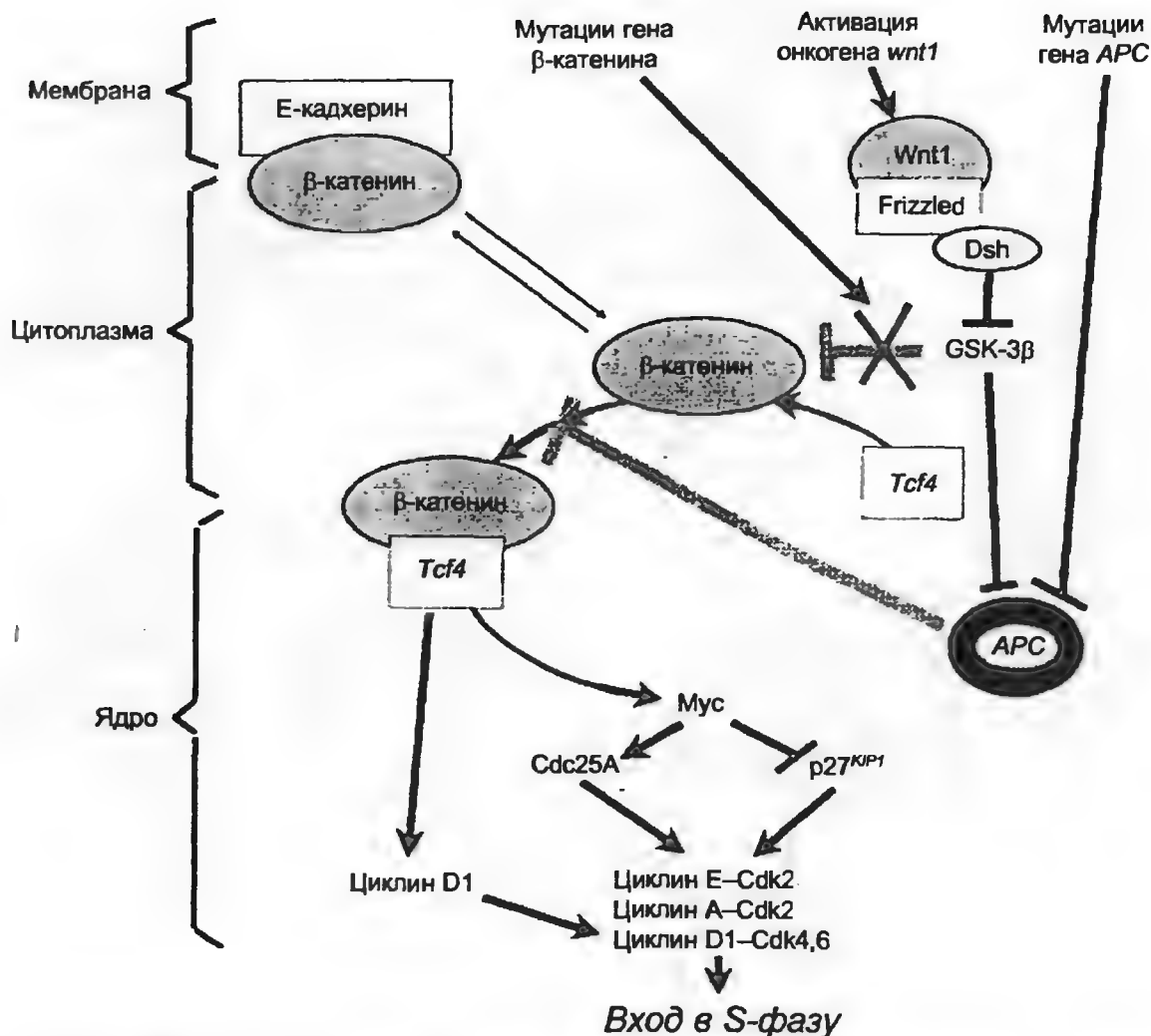


Рис. 3. Связывание TGF- $\beta$  со своим рецептором вызывает образование транскрипционных комплексов Smad4 – Smad2,3, которые транслоцируются из цитоплазмы в ядро. Это приводит к активации ряда мишеней, в том числе и ингибиторов циклинзависимых киназ p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, что вызывает подавление активности Cdk4,6 и Cdk2, ответственных за продвижение по G1 и вход в S-фазу (объяснения в тексте)

что мутации в гене E-кадгерина также могут быть ответственны за стимуляцию сигнальных путей, опосредуемых транскрипционными активностями  $\beta$ -катенина.

Подводя итоги этого раздела, заметим, что большинство известных протоонкогенов и опухолевых супрессоров тем или иным образом регулируют активность циклинзависимых киназ, ответственных за вход в S-фазу клеточного цикла. Продукты некоторых из клеточных (Mdm2) или вирусных (Т-антиген вируса SV40, E1A аденовирусов, E7 HPV и др.) онкогенов связывают и инактивируют основной субстрат таких Cdk-pRb. По-видимому, нарушения в сигнальных путях

→ Cdk2,4,6 → pRb → E2F/DP являются необходимыми для появления постоянно пролиферирующих неопластических клеток.

## 2. ОНКОГЕНЫ И ОПУХОЛЕВЫЕ СУПРЕССОРЫ В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА

Другой важнейшей точкой приложения активностей онкогенов и опухолевых супрессоров является регуляция апоптоза (программированной гибели клеток). Апоптоз, как известно, вызывается различными сигналами: связыванием с рецепторами специфических киллерных лиган-

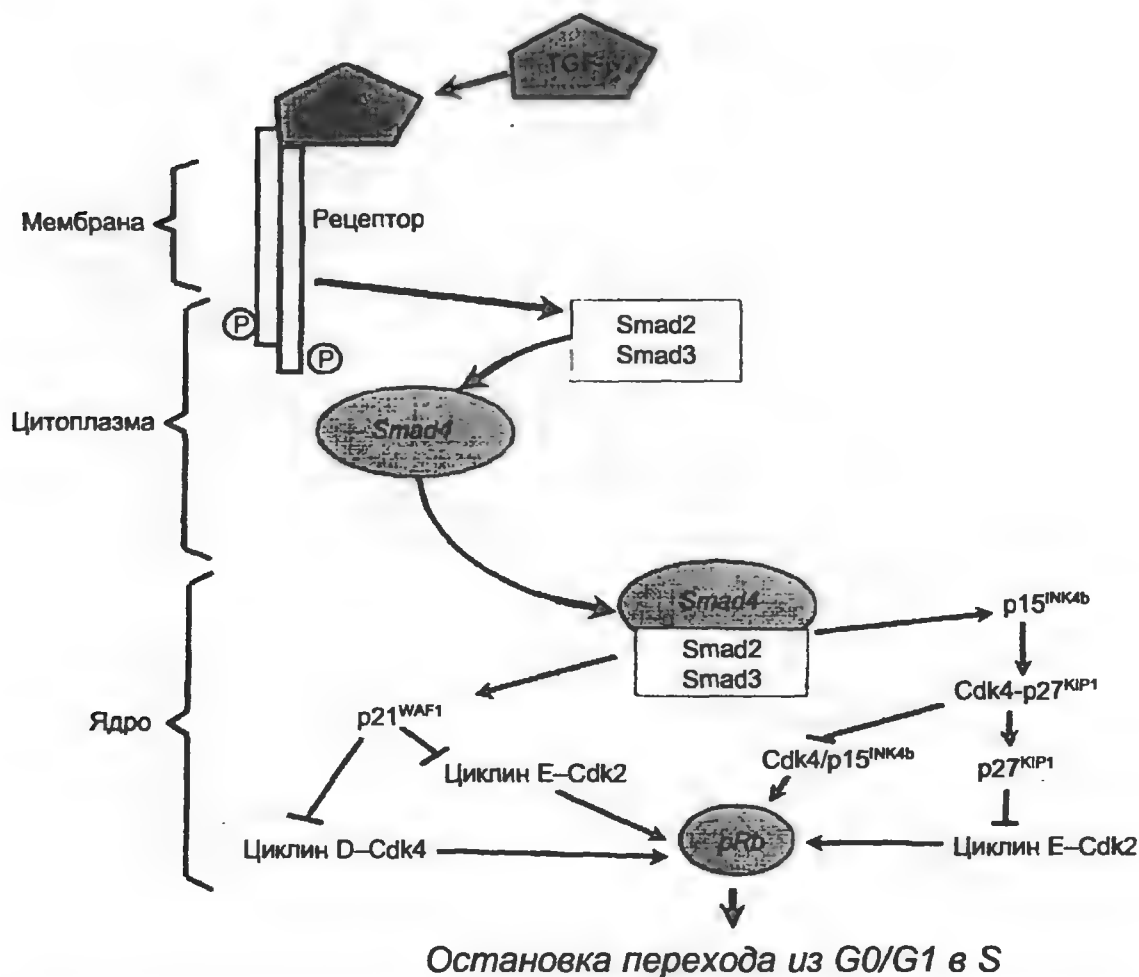


Рис. 4. Мутации опухолевых супрессоров APC и  $\beta$ -катенина, как и активация онкогена *wnt1*, стимулируют образование транскрипционных комплексов  $\beta$ -катенин-Tcf4, регулирующих гены *MYC* и циклина D1. В результате повышается активность ряда комплексов циклин-Cdk (объяснения в тексте)

дов, нехваткой факторов роста/выживания, повреждениями ДНК и разрушениями цитоскелета, гипоксией и другими неблагоприятными условиями (см. обзоры [49–52]). В регуляции апоптоза выделяют два основных этапа: фазу индукции (принятия решения) и фазу экзекуции (исполнения приговора). Последняя осуществляется путем активации каспаз – семейства цистеиновых протеиназ, расщепляющих свои субстраты по остаткам аспаратовой кислоты. Расщепление каспазами 3, 6, 7 (так называемые «эффекторные» или «казнящие» каспазы) ряда ключевых субстратов, в частности DFF45/ICAD – ингибитора нуклеазы DFF40/CAD (осуществляется каспазой 3), ламинов – ядерных цитоскелетных белков (осуществляется каспазой 6) и т.д., приводит к фрагментации ДНК и деструкции

клетки [52]. Каспазы присутствуют в цитоплазме в виде проэнзимов и активируются до полностью функциональных протеаз путем расщепления проэнзима на большую и малую субъединицы и дальнейшего отщепления от них N-концевых доменов. Затем субъединицы собираются в тетрамер с двумя активными центрами [49, 52]. Расщепление прокаспаз могут осуществлять различные протеазы, в том числе и другие каспазы.

Предполагается, что существует по меньшей мере два принципиально разных сигнальных пути, приводящих к активации каспаз 3, 6, 7 [49, 52] (рис. 5). Один из них инициируется связыванием специфических киллерных молекул (Fas-лиганд, TNF- $\alpha$  и др.) со своими рецепторами, что вызывает рекрутирование адаптерных белков и прокаспаз, в частности прокаспазы 8. Агрегация



ла и многие другие [13, 14, 56–58] (подробнее – см. статью П.М. Чумакова в этом же номере журнала), p53 осуществляет на транскрипционном уровне одновременно и активацию гена *bax*, и репрессию гена *bcl2* [57, 59]. Кроме того, p53 повышает экспрессию ряда генов *PIG*, продукты которых вызывают окислительный стресс и, как следствие, нарушения проницаемости митохондриальной и ядерной мембран [60], а также трансактивирует некоторые киллерные рецепторы, в частности Fas и KILLER/DR5 [57, 61, 62]. Таким образом, активация p53 дает мощный апоптогенный сигнал, в реализации которого задействованы различные механизмы индукции «казнящих» каспаз. Важно подчеркнуть, что p53-зависимый апоптоз элиминирует из организма не только поврежденные клетки, но и клетки, в которых наблюдается нерегулируемая стимуляция пролиферации, вызываемая, например, конститутивной активацией онкогена *MYC* и/или транскрипционного фактора E2F. Стабилизация p53 при активации онкогенов связана с индуцируемым E2F повышением транскрипции гена *p19<sup>ARF</sup>*, продукт которого препятствует Mdm2-зависимой деградации p53 [13, 14] (подробнее – см. статью П.М. Чумакова в этом же номере журнала). Естественно, что инактивирующие мутации p53 или *p19<sup>ARF</sup>*, нарушающие работу этого защитного механизма, будут резко увеличивать вероятность появления постоянно пролиферирующих клеточных клонов, а следовательно, и вероятность последующего развития из них злокачественных опухолей.

Интересно, что конститутивная экспрессия онкогенов Ras инициирует одновременно и апоптогенные и антиапоптогенные сигналы. Первые обусловлены активацией сигнального пути Ras-Raf-MAPK-E2F-p19<sup>ARF</sup>-p53 [63]. Вторые связаны как со способностью одного из эффекторов Ras – белка Raf – прямо фосфорилировать и инактивировать проапоптотический белок Bad (член семейства Bcl2), так и с действием другого эффектора Ras – PI3K (фосфоинозитол-3-киназы) [21, 51, 63, 64] (см. статью М.А. Красильникова в этом же номере журнала). Антиапоптотические эффекты PI3K обусловлены ее способностью активировать серин-треониновую протеинкиназу PKB/Akt (впервые была идентифицирована как онкоген ретровируса AKT8, вызывающего Т-клеточные лимфомы у мышей AKR), которая блокирует апоптоз несколькими путями [65] (см. рис. 5). Во-первых, она, как и Raf, обладает способностью фосфорилировать и инактивировать белок Bad. Кроме того, супрессируя функцию белка DAF-16 – транскрипционного фактора семейства Forkhead – PKB/Akt может ингибировать продукцию киллерных мо-

лекул, в частности Fas-лиганда. И, наконец, недавно обнаружено, что PKB/Akt активирует функцию транскрипционных факторов семейства Rel/NF-κB [65] (гомологи вирусного онкобелка v-Rel; амплификация и перестройки их генов характерны для многих новообразований человека [66]), которые, в свою очередь, ингибируют апоптоз несколькими путями (рис. 5). В частности, он трансактивирует ген, который кодирует белок A1/Bfl1 (член семейства белков Bcl2), ингибирующий выброс цитохрома c и/или AIF из митохондрий [67]. Наряду с этим NF-κB увеличивает экспрессию ингибиторов апоптоза IAP1 и IAP2, членов семейства белков IAP (Inhibitors of Apoptosis), блокирующих функцию каспаз 3, 6, 7, 8, 9 [66]. В связи с изложенным становится понятной одна из защитных функций опухолевого супрессора PTEN (его инактивация закономерно обнаруживается в глиомах, раках молочной железы и простаты, а врожденные мутации ведут к развитию синдрома множественных гамартом [68], табл. 2): белок PTEN, обладающий активностями тирозиновой фосфатазы, подавляет антиапоптотические эффекты сигнала PI3K–PKB/Akt [69].

Для неопластических клеток характерны нарушения функции и других опухолевых супрессоров, осуществляющих позитивную регуляцию апоптоза. Так, развитие хронического миелоидного лейкоза обуславливается хромосомной транслокацией t(9; 22), в результате которой образуется химерный ген *BCR/ABL*. Такая перестройка вызывает одновременно два важных последствия: а) резкое увеличение тирозинкиназной активности белка Abl, что ведет к стимуляции митогенного и антиапоптотического сигналов, опосредуемых Ras-регулируемыми сигнальными путями [70, 71], а также увеличением синтеза интегринов, обеспечивающим лучшее прикрепление к внеклеточному матриксу [72], и б) инактивацию апоптогенных активностей Abl [73–75], обусловленных, по-видимому, его участием в позитивной регуляции JNK (другое название SAPK, Stress Activated Protein Kinase), которая обладает способностью подавлять активность Bcl2 и, возможно, активировать p53 (рис. 5). Ряд данных указывают также на то, что белок Abl может непосредственно связываться с p53, модифицируя его проапоптотическую функцию [57, 65, 75].

Результатом хромосомной транслокации t(15; 17), наблюдающейся в подавляющем большинстве случаев острого промиелоцитарного лейкоза, является соединение гена рецептора ретиноевой кислоты (*RAR-α*) с геном опухолевого супрессора PML [3, 12, 76], продукт которого образует в ядре специфические матрикс-ассоциированные тельца. Предполагается, что химер-



ный белок PML/RAR- $\alpha$  инактивирует по доминантно-негативному механизму апоптогенную функцию нормального белка PML, образуя с ним гетеродимеры. Механизмы индукции апоптоза при гиперэкспрессии PML пока не совсем ясны. Получены данные об его участии в активации каспаз 1, 3 и рекрутировании белка Вах при апоптозе, индуцированном TNF- $\alpha$ , интерферонами 1 и 2, активацией Fas и повреждении ДНК [77, 78]. Помимо регуляции апоптоза PML контролирует также размножение и, вероятно, дифференцировку миелоидных предшественников. Так, показано, что трансактивация p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, ответственная за остановку клеточного цикла под воздействием ретиноевой кислоты, опосредуется именно PML [79]. Таким образом, экспрессия химерного белка PML/RAR- $\alpha$ , вызывающая инактивацию нормальной функции белка PML, как и перестройка BCR/ABL, ведет одновременно и к изменению регуляции клеточного цикла, и к частичному блокированию индукции апоптоза (следует заметить, что в отличие от BCR/ABL перестройка PML/RAR- $\alpha$  вызывает также и блок дифференцировки; см. раздел 8). В результате многонаправленного характера действия гибридных молекул появляются клетки с повышенным пролиферативным потенциалом и одновременно с устойчивостью к негативным регуляторным сигналам и/или неблагоприятным условиям окружающей среды. Предполагается, что такие изменения могут быть уже достаточными для развития по крайней мере некоторых форм гемобластозов. И, действительно, перестройки BCR/ABL или PML/RAR- $\alpha$  часто являются единственными генетическими изменениями, обнаруживаемыми соответственно при хроническом миелоидном и остром промиелоцитарном лейкозах [3, 12].

Однако для развития злокачественных форм солидных опухолей (раков, сарком и др.), безусловно, требуются и другие изменения, в первую очередь обуславливающие нарушения взаимодействия клеток со своими соседями и внеклеточным матриксом, и, в частности, потерю ими зависимости от субстрата и контактного торможения размножения; повышенную локомоторную активность, ответственную за инвазию в окружающие ткани и др.; способность неопластических клеток стимулировать прорастание сосудов (неоангиогенез) в ткани опухоли для обеспечения ее питания и т.д. В связи с этим неудивительно, что в клетках солидных опухолей число выявляемых мутаций и других генетических изменений, как правило, значительно выше, чем в клетках лейкозов. Число генетических перестроек нередко достигает в них нескольких десятков. Ясно, что, исходя из обычного темпа мутиро-

рования, характерного для нормальных клеток, нельзя объяснить появления в одной клетке такого количества генетических нарушений. Поэтому, прежде чем перейти к анализу роли протоонкогенов и опухолевых супрессоров в регуляции морфогенетических реакций клетки и неоангиогенеза, рассмотрим механизмы возникновения генетической нестабильности – еще одного важнейшего признака неопластической клетки.

### 3. ПРОТООНКОГЕНЫ И ОПУХОЛЕВЫЕ СУПРЕССОРЫ В КОНТРОЛЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ

Наблюдающееся в неопластических клетках подавление индукции апоптоза повышает жизнеспособность клеток, подвергшихся ДНК-повреждающим воздействиям, и, таким образом, само по себе уже увеличивает вероятность сохранения возникших генетических нарушений. Однако в клетке существуют и другие, более специализированные системы контроля целостности генома, нарушения работы которых также характерны для опухолевых клеток.

Системы контроля целостности генома условно можно разделить на две группы: 1) репарационные системы, выявляющие и исправляющие ошибки, которые приводят к изменениям последовательности нуклеотидов в ДНК, и 2) системы контроля клеточного цикла, предотвращающие дальнейшее размножение клеток, в которых уже произошли или могут произойти нарушения структуры или числа хромосом.

Изменения систем репарации характерны, по-видимому, для относительно небольшой части новообразований. Однако при развитии некоторых форм опухолей они могут играть основополагающую роль. Так, врожденные дефекты генов, продукты которых ответственны за эксцизионную репарацию ДНК, вызывают пигментную ксеродерму – синдром, характеризующийся развитием множественных опухолей кожи в местах, подвергающихся солнечному облучению [80]. Интересно, что, несмотря на участие эксцизионной репарации в исправлении дефектов, вызванных не только УФ-облучением, но и самыми разными мутагенами/канцерогенами [81, 82], частота возникновения других форм опухолей при пигментной ксеродерме почти не увеличивается. При этом у трансгенных мышей с аналогичными дефектами системы эксцизионной репарации отмечается повышение частоты индукции химическими канцерогенами опухолей внутренних органов [82]. Преимущественное возникновение у пациентов с пигментной ксеродермой опухолей кожи может указывать

на незначительную роль химических факторов, загрязняющих окружающую среду, в развитии новообразований у человека [83].

Врожденные дефекты другой репарационной системы, исправляющей ошибки репликации ДНК, которые приводят к образованию неспаренных оснований («mismatch repair»), вызывают синдром Линча. Главной чертой этого синдрома является развитие опухолей толстого кишечника (так называемый «наследственный неполипозный колоректальный рак») и/или опухолей яичника [83–86]. (Преимущественное возникновение именно опухолей кишечника при дефектах этой системы репарации, возможно, связано с высочайшим пролиферативным потенциалом клеток на дне кишечных крипт, что, естественно, ведет и к более частому появлению ошибок репликации.) Идентифицированы четыре гена – *MSH2*, *MLH1*, *PMS1* и *PMS2*, инактивирующие мутации в которых приводят к этому состоянию [84–86]. Маркером инактивации любого из этих генов является легко выявляемая нестабильность микросателлитных последовательностей ДНК [83, 87]. Нарушения в системе репарации неспаренных оснований характерны и для некоторых форм спорадических (ненаследственных) опухолей: они обнаруживаются в 13–15% опухолей толстой кишки, раков желудка и эндометрия, но значительно реже (<2%) в других новообразованиях [83].

Предполагается, что нарушения в системе репарации двунитевых разрывов ДНК, осуществляемой путем гомологичной рекомбинации, также могут приводить к развитию определенных форм опухолей. На это указывает тот факт, что супрессорные белки *BRCA1* и *BRCA2*, герминальные мутации которых ответственны за наследственные формы рака молочной железы и яичников [85, 86, 88], обладают способностью образовывать комплекс с белком *RAD51* – гомологом бактериального белка *RecA*, ответственным за гомологичную рекомбинацию, а инактивация («нокаут») генов *BRCA1* и *BRCA2* приводит к резкому повышению чувствительности к  $\gamma$ -облучению [89–91]. Однако пока окончательно неясно, действительно ли канцерогенез при нарушениях функции *BRCA1* и *BRCA2* обусловлен именно этими, а не какими-то другими их активностями. В частности, следует заметить, что репарация двунитевых разрывов ДНК происходит в определенные периоды клеточного цикла, остановка в которых резко увеличивает эффективность процесса. Не исключено, что способность белка *BRCA1* повышать экспрессию  $p21^{WAF1/CIP1}$  через  $p53$ -зависимые и  $p53$ -независимые механизмы [30, 31] и, наоборот, подавлять транскрипционную способ-

ность белка Мус [92] направлена именно на остановку клеточного цикла в поврежденных клетках.

Если нарушения репарационных систем и связанная с ними «нуклеотидная нестабильность» причастны к развитию относительно небольшого числа определенных форм опухолей, то «хромосомная нестабильность», вытекающая из нарушений нормальной регуляции клеточного цикла, характерна, по всей видимости, для подавляющего большинства солидных опухолей. В клеточном цикле постулировано существование так называемых «сверочных точек» (checkpoints), прохождение которых возможно лишь в случае нормального завершения предыдущих этапов и отсутствия поломок. Выделяют по меньшей мере четыре такие точки: в G1, S, G2 и «точку проверки сборки веретена деления» в митозе [27, 93–95].

**Сверочная точка в G1.** Основное требование к клетке, вступающей в S-фазу, – интактность ДНК, так как репликация поврежденной ДНК приведет к передаче генетических аномалий потомству. Поэтому клетки, подвергшиеся мутагенным воздействиям, вызывающим разрывы ДНК (УФ- и  $\gamma$ -облучение, алкилирующие соединения и др.), останавливаются в G1 и не входят в S-фазу [95, 96]. Остановка в G1 наблюдается не только после ДНК-повреждающих воздействий, но и при других состояниях, в том числе приводящих к нарушениям числа хромосом – при незавершенности предыдущего клеточного цикла митозом (расхождением хромосом) [97], при неправильной сегрегации хромосом во время митоза, приведшей к образованию микроядер [98], а также при разрушении микротрубочек, которое впоследствии может вызвать нарушения митоза [99]. Остановка в G1 может быть необратимой, как это наблюдается в случае  $\gamma$ -облучения [100], или обратимой, прекращающейся с окончанием действия фактора, ее вызвавшего, например, при восстановлении нормального пула нуклеотидов [56, 101] или при реставрации системы микротрубочек [98].

**Сверочная точка в S-фазе** контролирует правильность репликации ДНК. В частности, остановка в определенный период S-фазы наблюдается при недостатке нуклеотидов в клетках, не остановившихся в силу каких-либо причин в G1 [102].

**Сверочная точка в G2.** Повреждения ДНК и другие нарушения вызывают остановку клеток не только в G1- и S-, но и в G2-фазе клеточного цикла. При этом выявляются повреждения, пропущенные при прохождении предыдущих сверочных точек либо полученные на последующих стадиях клеточного цикла. Кроме того, в



следствиями дисфункции p53, в частности утратой механизма, ограничивающего образование дополнительных центросом [109], резко увеличивает вероятность появления пролиферирующих клеток со спонтанно возникшими или индуцированными генетическими аномалиями – изменениями числа хромосом [110–112], разрывами и рекомбинациями хромосом [110, 112, 113] или амплификацией отдельных генов [112, 114–116]. Важно подчеркнуть, что восстановление нормальной функции p53 в клетках, ее утративших, наоборот, приводит к уменьшению темпа возникновения генетических нарушений [111].

Дестабилизация генома наблюдается и при нарушениях функции других опухолевых супрессоров, в частности pRb. Однако в этом случае частота появления и спектр генетических изменений в делящихся клетках значительно меньше, чем в клетках с дисфункцией p53. Вероятно, это объясняется тем, что инактивация pRb ослабляет только работу сверхочной точки в G1 (рис. 6), но существенно не влияет на сверхочную точку в G2, а главное – не блокирует p53-зависимый апоптоз в аномальных клетках.

Активация некоторых протоонкогенов также может ослаблять работу сверхочных точек клеточного цикла (рис. 6) и, как следствие, увеличивать генетическую нестабильность. Так, гиперэкспрессия Мус позволяет преодолеть ингибирующее действие p21<sup>WAF1</sup> на комплексы циклин D–Cdk4 и циклин E–Cdk2, отменяя таким образом остановку в G1, вызываемую активацией p53. Гиперфункция Ras тоже может вызывать ослабление работы сверхочных точек в G1 и G2 и индуцировать генетическую нестабильность, но проявляться такие эффекты могут только в клетках, имеющих те или иные аномалии p53-регулируемых сигнальных путей [117].

Итак, часто встречающиеся в новообразованиях человека изменения опухолевых супрессоров (инактивация p53, pRb и, возможно, p16<sup>INK4a</sup>–p19<sup>ARF</sup>) и/или протоонкогенов (активация Мус, Ras и, возможно, других) приводят к дисфункции сверхочных точек клеточного цикла и нестабильности генома. Кроме того, в опухолевых клетках закономерно выявляются изменения и некоторых других генов, ответственных за поддержание целостности генома. Более того, врожденные инактивирующие мутации не только p53 или pRb, но и некоторых из генов репарационных систем неизменно приводят к развитию определенных новообразований. Это свидетельствует о важнейшей роли генетической нестабильности в генезе опухолей и/или их дальнейшей прогрессии. Хотя повышенная нестабильность генома, вероятно, не является строго необходимой для онкогенеза, без нее

практически невозможно возникновение в одной клетке достаточного числа мутаций, определяющих злокачественный характер роста солидных опухолей. Создавая гетерогенность клеточных популяций, генетическая нестабильность постоянно предоставляет материал для отбора все более и более автономных и агрессивных клеток.

#### 4. ОНКОГЕНЫ, ОПУХОЛЕВЫЕ СУПРЕССОРЫ И НАРУШЕНИЯ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ КЛЕТКИ

Ярким отличительным свойством неопластических клеток является «асоциальный» тип их поведения, связанный в первую очередь с нарушениями нормальных морфогенетических реакций – потерей контактного торможения размножения, приобретением способности к пролиферации независимо от прикрепления к субстрату, изменениями адгезионных взаимодействий, формы и подвижности клеток и т.д. Именно эти нарушения вместе с некоторыми другими свойствами, в частности способностью секретировать протеолитические ферменты и ангиогенные факторы, определяют инвазивный характер роста (проникновение в окружающие здоровые ткани), а впоследствии и метастазирование (образование вторичных очагов опухолевого роста) [118]. Первостепенную роль в возникновении указанных выше нарушений морфогенетических реакций играют изменения функции протоонкогенов и/или опухолевых супрессоров (рис. 7, 8).

Присущее нормальным клеткам контактное торможение размножения (прекращение пролиферации при установлении контактов с окружающими клетками) связывают в первую очередь с повышением экспрессии опухолевых супрессоров p16<sup>INK4a</sup> и p27<sup>KIP1</sup> [37, 119, 120], что обуславливает недофосфорилирование pRb и блокирование входа в S-фазу [17] (см. раздел 1). Пути передачи сигнала от плазматической мембраны к ингибиторам циклинзависимых киназ пока неясны. Показано только, что повышение в эпителиальных клетках экспрессии E-кадгерина, вызванное трансдукцией его гена, ведет к накоплению p27<sup>KIP1</sup> и остановке клеточного роста [121]. Недавно появились данные о существовании в эпителиальных клетках еще одного пути блокирования клеточного цикла в ответ на установление межклеточных контактов. Промонстрировано, что образование эпителиального пласта вызывает накопление p53, тогда как мутации E-кадгерина и/или разобщение межклеточных

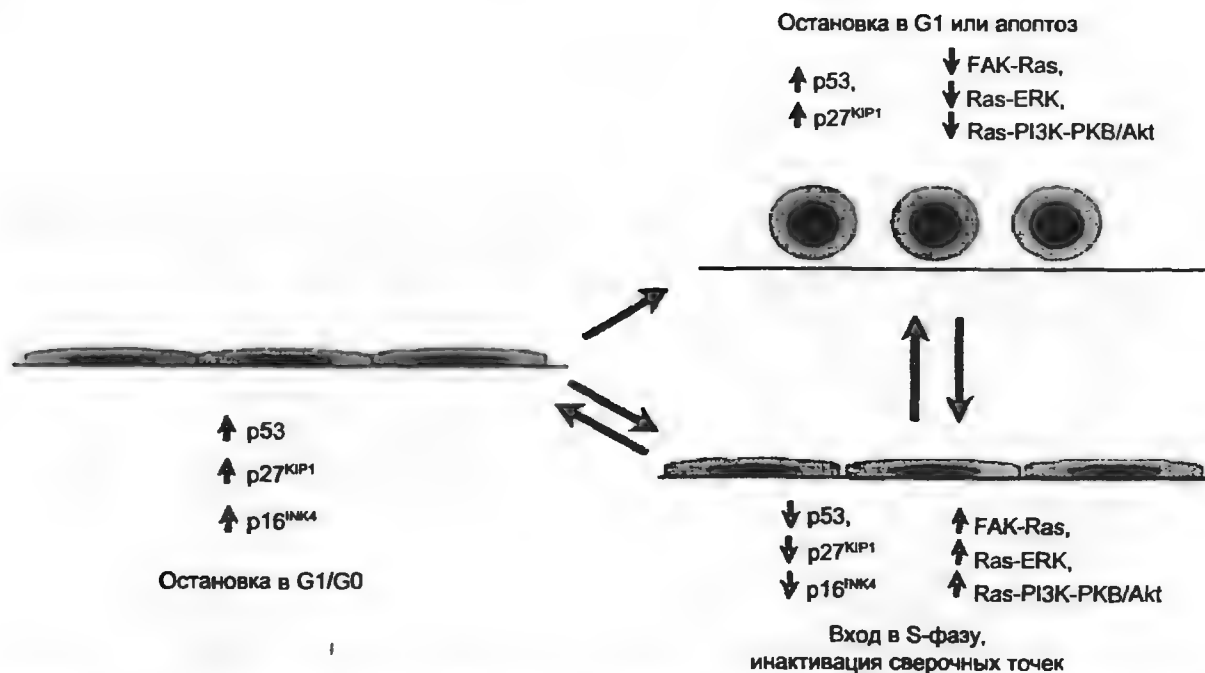


Рис. 7. Изменения активности супрессорных белков и контролируемых протоонкогенами сигнальных путей, определяющие зависимость клеток от прикрепления к субстрату, и контактное торможение размножения (объяснения в тексте)



Рис. 8. Регулируемые онкогенами сигнальные пути, ответственные за изменения морфологии и локомоторный фенотип неопластических клеток (объяснения в тексте)

контактов, наоборот, вызывают дестабилизацию p53 и, как следствие, прекращение ингибирующего воздействия p21<sup>WAF1</sup> на комплексы циклин – Cdk. В связи с этим можно думать, что онкогенный потенциал мутаций Е-кадхерина, ответственных за развитие наследственных форм рака желудка и многих других новообразований [122], по крайней мере частично обусловлен изменениями регуляции клеточного цикла, апоптоза и контроля генетической стабильности [123].

Наряду с инактивацией ряда опухолевых супрессоров (Е-кадхерин, p53, p27<sup>KIP1</sup>, pRb), вызванной мутациями или связыванием с вирусными онкобелками (pRb – с E1A, E7, T-SV40; p53 – с E1B, E6, T-SV40; p27<sup>KIP1</sup> – с E1A и т.д. [7, 10, 124]), к потере контактного торможения размножения может приводить и гиперфункция протоонкогенов, модифицирующих активность сигнального пути Cdk-pRb-E2F. В частности, она может быть вызвана повышением экспрессии Мус или активацией протоонкогена Ras (первый вызывает деградацию p27<sup>KIP1</sup> и трансктивацию Cdc25a, второй – деградацию p27<sup>KIP1</sup> и повышение экспрессии циклина D1, см. раздел 1).

Независимость от прикрепления к внеклеточному матриксу (anchorage independence). Чтобы выживать и пролиферировать, нормальные клетки большинства типов должны быть прикреплены к внеклеточному матриксу. Два глав-



ных фактора лежат в основе этого явления: неспособность ростовых факторов активировать в неприкрепленных клетках комплексы циклин E-Cdk2, ответственные за вход в S-фазу [125], и индукция апоптоза во многих типах клеток при отсутствии адгезионных взаимодействий (этот тип апоптоза имеет специальное название «аноикс») [126]. И подавление пролиферации, и индукция апоптоза в неприкрепленных клетках могут быть связаны с активацией p53, вызываемой откреплением клеток от субстрата и отсутствием сигналов от рецепторов интегринов [58, 127]. За подавление входа в S-фазу кроме активации сигнального пути p53-p21<sup>WAF1</sup>, по всей видимости, ответственна и аккумуляция p27<sup>KIP1</sup>, также закономерно наблюдающаяся при отсутствии контактов клеток с матриксом [127, 128]. Однако помимо запуска механизмов негативного контроля пролиферации (блокирование входа в S-фазу и индукция апоптоза) в ответ на открепление клеток от матрикса существуют и независимые механизмы позитивной регуляции выживаемости и размножения клеток, инициируемые связыванием интегринов с белками внеклеточного матрикса и последующей активацией нерецепторной тирозинкиназы FAK (Focal Adhesion Kinase – ключевого участника передачи сигналов от интегриновых рецепторов, физически взаимодействующего с цитоплазматическим доменом  $\beta$ -субъединицы интегрин [118, 126]). Во-первых, связывание интегринов с матриксом и активация FAK необходимы для прохождения митогенного сигнала от рецепторов ростовых факторов (EGF, PDGF) до конечных MAP-киназ – ERK1/2. (В неприкрепленной клетке сигналы от этих ростовых факторов блокируются на промежуточной MAP-киназе MEK1, которая в силу каких-то неизвестных пока причин не фосфорилирует свои мишени – ERK1/2 [64].) Во-вторых, активируя Ras через адаптерный белок Shc, интегриновые рецепторы не только стимулируют митогенный сигнал, но и подавляют аноикс (апоптоз), по всей видимости, за счет активации сигнального пути Ras-PI3K-PKB/Akt [126] (см. раздел 2). Если исходить из факта существования нескольких механизмов, определяющих зависимость жизнеспособности и/или размножения клеток от их связывания с матриксом, становится понятным, что для возникновения характерной для опухолевых клеток независимости от адгезионных взаимодействий необходимо, по-видимому, несколько событий, которые, с одной стороны, позволяли бы преодолевать супрессорные эффекты p53 (мутации/делеции этого гена, гиперэкспрессия онкогена *MDM2* и др.) и/или p27<sup>KIP1</sup> (мутации/делеции; гиперэкспрессия онкогенов *RAS* и

*MYC*, приводящая к деградации данного белка, и др.), а с другой, обходить прерывание митогенного сигнала на уровне MEK1-киназы (например, за счет активации белков Src или Muc, вызывающих активацию комплексов циклин E-Cdk2) и блокировать аноикс по сигнальному пути Ras-PI3K-PKB/Akt.

**Изменения формы и подвижности клеток.** Изменение формы (морфологии) – характерное свойство опухолевых клеток, позволяющее при микроскопическом исследовании диагностировать злокачественную трансформацию. В основе морфологических нарушений лежат связанные между собой изменения цитоскелета, адгезионных взаимодействий клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом. Вкратце они выражаются в нарушении формирования фокальных контактов и в ухудшении прикрепления клеток к матриксу, дезорганизации системы актиновых микрофиламентов. Это приводит к изменениям активности псевдоподий и характера перемещения клеток. В целом наблюдаемая картина напоминает изменения, возникающие в нормальных клетках при действии митогенных цитокинов – факторов, стимулирующих передвижение клеток. Однако так называемый «локомоторный» фенотип в неопластических клетках, как правило, сильно утрирован, что позволяет отличать по морфологии опухолевую клетку от движущейся нормальной клетки.

Молекулярные механизмы, определяющие возникновение локомоторного фенотипа, как в нормальных клетках при митогенных стимулах, так и при неопластической трансформации, пока далеки от ясности. Выявлены лишь некоторые ключевые узлы в пересекающихся цепях передачи сигналов, ответственных за возникновение этих изменений. Как известно, многие цитокины (например, HGF/SF, EGF, FGF, PDGF, IGF-1 и др.) являются одновременно и митогенами, и мотогенами [118]. Так, HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor) является сильным митогеном для гепатоцитов, но мотогеном для различных эпителиальных клеток, в частности клеток молочной железы, эндотелиоцитов и др. Митогенный эффект HGF/SF зависит от вызываемой им стимуляции Ras-Raf-MAPK сигнальных путей: об этом свидетельствует его отмена при ингибировании функции MEK1 и блокировании передачи сигнала к ERK1/2 [129–131]. В то же время одного только повышения активности Raf, по-видимому, недостаточно для разборки в эпителиальных клетках E-кадхеринных межклеточных контактов и стимуляции локомоции клеток – необходима одновременная активация и PI3K, которая при действии HGF/SF может индуцироваться как по

Ras-зависимому, так и по Ras-независимым сигнальным путям [130, 132]. Эффекторы PI3K, ответственные за реализацию мотогенного эффекта, неизвестны. Показано только, что ни PKB/Akt, ни Ras сами по себе его не обеспечивают [130], хотя базальный уровень активности Ras, по-видимому, необходим для осуществления перестройки цитоскелета и разъединения межклеточных контактов, требующихся для локомоции [132]. Показано также, что одним из важных эффектов, вызываемых HGF/SF в клетках лейомиосаркомы, является понижение экспрессии гена фибронектина, что может изменять адгезионные взаимодействия с матриксом и локомоцию [133]. Мутации гена рецептора HGF/SF (протоонкогена Met), приводящие к перманентной стимуляции его тирозинкиназной активности, являются онкогенными: они способны вызывать морфологическую трансформацию в культивируемых *in vitro* клетках [134] и ответственны за развитие наследственного папиллярного рака почки, а также некоторых других заболеваний человека (табл. 1). Молекулярные основы мотогенных эффектов других цитокинов изучены еще хуже, но предполагается, что, как и в случае с HGF/SF, они связаны со стимуляцией Ras-PI3K и Ras-MAPK сигнальных путей [135–139].

Конститутивная экспрессия активированных онкогенов Ras вызывает и в фибробластах, и в эпителиальных клетках резкое повышение локомоторной активности и стойкие морфологические изменения, характерные для неопластических клеток [140, 141] (заметим, однако, что эти изменения хорошо проявляются только в клетках с аномалиями p53- и/или p16<sup>INK4a</sup>-регулируемых сигнальных путей; в остальных случаях в ответ на перманентную гиперэкспрессию Ras может индуцироваться либо апоптоз, либо остановка в G1, уменьшающая степень выраженности Ras-индуцированных морфологических изменений [117, 142] (см. статью Чумакова в этом же номере журнала). Предполагается, что несколько эффекторов Ras, в первую очередь Raf и GTPазы семейства Rho (Rac, Cdc42, Rho), ответственны за проявление морфологической трансформации и за стимуляцию локомоторной активности неопластических клеток [20, 143] (рис. 8). Как и при мотогенных эффектах цитокинов, ключевую роль здесь, по-видимому, играет активация двух сигнальных каскадов: Ras-PI3K-Rac и Ras-Raf-ERK [20, 143–145]. Для трансформации фибробластов, очевидно, достаточно конститутивной активации любого из этих путей. Действительно, трансдукция активированного Rac1, как и активированных Raf, Mos (подобно Raf стимулирует MEK1), или самой MEK1 может вызывать морфологическую транс-

формацию фибробластов грызунов [146–150], а блокирование в Ras-трансформированных клетках функции либо MEK1, либо Rac, хотя и приводит к частичной реверсии морфологических изменений, но не предотвращает трансформацию [148, 151]. В то же время в эпителиальных клетках, хорошо трансформирующихся онкогеном Ras, активации Raf-ERK-каскадов недостаточно, чтобы вызвать морфологическую трансформацию [149]. Экспрессия активированного Ras придает эпителиальным клеткам некоторые признаки трансформированного фенотипа (в первую очередь образование ламеллоподий и рафплинг мембран [143, 152]), однако сильная морфологическая трансформация достигается, по-видимому, только при совместной активации Ras-зависимых и Raf-ERK сигнальных путей [144, 153].

О молекулярных событиях, ответственных за морфологическую трансформацию при активации Ras и Raf-ERK сигнальных путей, известно очень мало. Стимуляция MAP-киназ ERK1/2 ведет, как известно, к активации ряда транскрипционных факторов, в частности Elk1, Fos, SRF. Заметим, что одним из важнейших последствий гиперфункции Ras является стимуляция другого MAP-киназного каскада (рис. 8), конечный продукт которого – JNK – вызывает активацию транскрипционных факторов Jun и ATF2. Таким образом, и Raf-ERK-, и Ras-JNK-сигнальные пути регулируют активность транскрипционных комплексов AP-1 (состоит из гомодимеров Jun/Jun или гетеродимеров Jun/Fos), функция которых представляется весьма важной для индукции морфологических изменений. Об этом свидетельствуют как способность самого онкогена Jun вызывать трансформацию клеток [154, 155], так и реверсия трансформированного фенотипа при подавлении функции Jun [156, 157]. Не исключено, впрочем, что трансформирующий потенциал Jun (AP-1) связан не с прямым действием на мишени, регулирующие адгезивные взаимодействия, организацию цитоскелета и локомоцию, а с образованием аутокринной петли, обусловленной стимуляцией продукции ростовых факторов/мотогенов (EGF и др.), которые в свою очередь активируют Ras и его эффекторы, в частности Rac и другие GTPазы семейства Rho (Cdc42, RhoA), ответственные за изменения морфологии [155, 157] (рис. 8). Так, предполагается, что Rac обеспечивает образование ламеллоподий и рафплинга, Cdc42 вызывает образование филоподий, а RhoA участвует в формировании фокальных контактов и стресс-фибрилл [143, 152].

Существующие модели рассматривают образование ламеллоподий как следствие Ras-индуцированного повышения активности белка

Por1 [126, 152], возникновение стресс-фибрилл – как следствие активации миозинфосфатазы под действием Rho-киназы, а образование фокальных контактов – как результат связывания с актином цитоскелетных белков профилина и гельзолина, стимулируемого фосфатидилинозитолбифосфатом – одной из мишеней Rho [126, 152]. Пока неясно, однако, обеспечиваются ли все эти реакции передачей сигналов исключительно между цитоплазматическими белками или изменение активности множества транскрипционных факторов также вносит свой вклад в эти процессы.

Таким образом, главенствующую роль в морфологической трансформации и приобретении локомоторного фенотипа играют, очевидно, протоонкогены, изменения активности которых приводят к активации белков семейства Ras и/или его эффекторов – PI3K, Raf и, возможно, RalGDS. По-видимому, только совокупность вызываемых ими изменений в регуляции активности псевдоподий, сборки/разборки цитоскелета и фокальных контактов при одновременном изменении активности большого набора транскрипционных факторов обеспечивает в конце концов приобретение клетками так называемого «полностью трансформированного» фенотипа, определяющего агрессивный характер роста. Следует, однако, учитывать, что для проявления этих изменений необходима инактивация опухолевых супрессоров (p53 p19<sup>ARF</sup> и/или p16<sup>INK4a</sup>), предохраняющих организм от появления в нем клонов клеток с конститутивно активированными Ras-МАР-киназными сигнальными путями. Кроме того, выраженность морфологической трансформации и способности к локомоции уменьшаются при повышении экспрессии некоторых других опухолевых супрессоров – Е-кадгерина [118] и pRb [158]. Более того, два других важнейших признака неопластической клетки – ослабление контактного торможения размножения и приобретение независимости от субстрата – зависят в первую очередь от инактивации определенных опухолевых супрессоров – p53, p27<sup>KIP</sup>, Rb, Е-кадгерина. Поэтому кажется очевидным, что для возникновения характерных для опухолевых клеток изменений морфогенетических реакций требуется несколько генетических событий (мутаций), затрагивающих и опухолевые супрессоры, и протоонкогены.

## 5. ОНКОГЕНЫ И ОПУХОЛЕВЫЕ СУПРЕССОРЫ В НЕОАНГИОГЕНЕЗЕ

Неоангиогенез – формирование сети капилляров из эндотелиальных клеток, выстилающих

мелкие венулы – необходимое условие для дальнейшего роста опухолевого узелка, достигшего в диаметре 2–4 мм [118, 159]. Приобретение неопластическими клетками способности стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток связано, очевидно, с двумя основными событиями: прекращением секреции ими факторов, ингибирующих ангиогенез (тромбоспондины и др.), и увеличением продукции цитокинов, являющихся факторами роста и мотогенами для эндотелиоцитов (в первую очередь VEGF, а также FGF, EGF, TGF- $\alpha$ ), сопровождающимся повышением секреции и/или активности протеаз, обеспечивающих протеолиз внеклеточного матрикса и инвазию эндотелиоцитов в ткани новообразования.

Ключевую роль в возникновении ангиогенного фенотипа неопластических клеток играет, по-видимому, инактивация функции опухолевого супрессора p53, контролирующего экспрессию некоторых ингибиторов и стимуляторов ангиогенеза. Так, гены тромбоспондинов 1 и 2 являются мишенью транскрипционного действия p53 [160, 161], а транскрипцию гена VEGF p53, наоборот, подавляет [162, 163]. Вместе со способностью p53 активироваться в ответ на гипоксию [164] это предопределяет еще один механизм, посредством которого нормальное функционирование p53 может защищать организм от опухолевого роста: гипоксия, возникающая в центре неопластического узелка, индуцирует p53 и, как следствие, апоптоз или остановку клеточного цикла, сопровождающуюся повышением секреции тромбоспондинов и снижением экспрессии VEGF, что должно предотвращать неоваскуляризацию узелка. Естественно поэтому, что инактивация p53 может являться важным этапом в приобретении способности стимулировать ангиогенез. Действительно, при анализе механизмов возникновения ангиогенного фенотипа в человеческих фибробластах было обнаружено, что в большинстве случаев именно инактивация p53 является инициальным событием [165].

К дальнейшему усилению способности стимулировать ангиогенез может приводить экспрессия онкогенов, в частности онкогенов семейства RAS, вызывающих активацию транскрипционного комплекса AP-1 и, как следствие, с одной стороны, повышение секреции VEGF, ген которого содержит респонсивные элементы для AP-1 [165–169], а с другой, увеличение продукции ряда матриксных металлопротеиназ (MMP-9/коллагеназа IV, MMP-1 и др.) [169–171], гены которых также регулируются AP-1 [172, 173] и другими Ras-индуцируемыми транскрипционными факторами, в частности Ets1 [172, 173].

Следует заметить, что последовательность событий, приводящих к развитию ангиогенного фенотипа, может быть и иной: в фибросаркомах у трансгенных мышей появление ангиогенного фенотипа инициировалось не мутациями p53, а повышением экспрессии JunB и c-Jun компонентов комплекса AP-1 и последующим повышением секреции из опухолевых клеток FGF- $\beta$  [174]. Получены данные о роли и других онкогенов и опухолевых супрессоров в регуляции ангиогенеза. Так, Мус подавляет транскрипцию тромбоспондина 1 [26], тогда как опухолевый супрессор VHL, мутации которого вызывают синдром фон Хиппеля–Линдау (развитие множественных гемангиом) и карциномы почки [175] (табл. 2), осуществляет негативную регуляцию экспрессии гена VEGF в стромальных клетках гемангиом [176] и клетках почечного эпителия [177]. Таким образом, очевидно, что изменения активности определенных опухолевых супрессоров и онкогенов играют решающую роль в стимуляции ангиогенеза.

#### 6. РОЛЬ ОНКОГЕНОВ И ОПУХОЛЕВЫХ СУПРЕССОРОВ В ПРИОБРЕТЕНИИ СПОСОБНОСТИ К МЕТАСТАЗИРОВАНИЮ

Метастазирование – образование вторичных очагов опухолевого роста – наиболее опасное проявление прогрессии новообразований, являющееся основной причиной смерти онкологических больных. Чтобы дать метастаз, клетка должна приобрести ряд свойств: умение проникать в глубину окружающих нормальных тканей (в том числе в кровеносные или лимфатические сосуды), способность выживать после попадания в сосуды, а затем пенетрировать их и размножаться в несвойственном для данного типа клеток микроокружении, давая новый очаг опухолевого роста [118]. Таким образом, способность к метастазированию складывается из комплекса более простых признаков, значительная часть которых – приобретение локомоторного фенотипа и повышенной протеолитической активности, способность стимулировать ангиогенез и создавать тем самым пути эвакуации опухолевых клеток из первичного очага, возникновение независимости от субстрата и подавление апоптоза, – уже была рассмотрена в предыдущих разделах. Появление каждого из этих признаков увеличивает вероятность развития метастатического потенциала. Однако наиболее важными представляются гены и белки, такие, например, как p53, Ras и Src, изменения активности которых приводят к возникновению

сразу нескольких компонентов метастатического фенотипа, а, кроме того, – к генетической нестабильности, облегчающей появление дополнительных признаков, необходимых для метастазирования. Интересно, что p53, нарушения функции которого существенно увеличивают способность клеток давать метастазы в модельных системах *in vivo* [58, 178, 179], помимо всего прочего прямо активирует транскрипцию недавно открытого гена KAI1 [180] – трансмембранного белка, образующего комплексы с E-кадхерином. Потеря экспрессии белка KAI1, обусловленная в том числе и инактивацией p53 [180], закономерно обнаруживается в различных опухолях человека на поздних стадиях заболевания (60–90% случаев рака предстательной, поджелудочной и молочной желез, мелкоклеточного рака легкого, гепатоцеллюлярного рака и др.) [181–185], а восстановление его экспрессии вызывает ингибирование метастатического процесса [186–188]. Кальцийсвязывающий белок S100A4/MTS1/CAPL (метастазин), наоборот, гиперэкспрессируется на поздних стадиях развития различных новообразований человека [189] и обладает способностью придавать клеткам инвазирующий и метастатический потенциал [190–192]. Его экспрессия также вызывает плеiotропный эффект: она приводит к уменьшению содержания E-кадгерина [193], подавлению синтеза ингибитора металлопротеиназ TIMP-1 [194], изменениям регуляции динамики реорганизаций цитоскелета в результате ингибирования фосфорилирования тяжелой цепи миозина [195] и, возможно, к секвестрированию и функциональной инактивации p53 [189].

Разумеется, описанные выше изменения не исчерпывают перечень контролируемых опухолевыми супрессорами и/или протоонкогенами признаков, которые могут играть существенную роль в приобретении способности к метастазированию. Так, значительный интерес представляет описанный Г.И. Дейчман так называемый «H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>CA</sup> + PGE<sub>2</sub><sup>S</sup>»-фенотип, заключающийся в повышении антиоксидантных активностей, секреции простагландина E<sub>2</sub> и, как следствие, в приобретении еще большей устойчивости к факторам естественной противоопухолевой резистентности и приобретенного иммунитета [196, 197]. Этот фенотип индуцируется в культивируемых *in vitro* клетках путем трансдукции определенных изоформ онкогена v-src, но не другими исследованными генами (активированный H-ras, *myc*, *bcl2*, мутантный p53, E1A, LT SV40), или возникает в процессе роста опухоли *in vivo*, причем метастатическая способность клеток коррелирует с его появлением (см. статью Г.И. Дейчман в этом же номере журнала). Очевидно, в ближайшие годы нас ждут и другие важные наход-



ки, проливающие свет на механизмы метастазирования и роль в этих процессах опухолевых супрессоров и онкогенов.

## 7. РОЛЬ ОНКОГЕНОВ И ОПУХОЛЕВЫХ СУПРЕССОРОВ В ИММОРТАЛИЗАЦИИ НЕОПЛАСТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Чтобы образовать из одной клетки-родоначальницы сначала опухоль, а затем и метастазы, требуется очень большое число клеточных делений. Между тем хорошо известно, что существует механизм, ограничивающий число делений большинства нормальных клеток (заведомое исключение составляют стволовые клетки). Так, в культурах *in vitro* фибробласты и эпителиальные клетки человека после 50–60 делений (так называемое «число Хейфлика») необратимо останавливаются в G1- или G2-фазах клеточного цикла [198] (этот феномен получил название «репликативное старение») (см. обзоры [199–202]). В основе работы такого счетно-ограничительного механизма лежит прогрессивное укорочение длины теломер в результате неполной репликации концевых участков хромосом в каждом из митотических циклов [203–205]. По существующим представлениям остановка клеточного цикла обусловлена образованием «липких» концов хромосом, что вызывает их соединение и запуск реакций, аналогичных наблюдаемым при действии ДНК-повреждающих агентов [200]. Однако в клетках с активной теломеразой – ферментом, осуществляющим элонгацию *de novo* теломерных повторов ДНК, или при активизации других, так называемых «альтернативных механизмов удлинения теломер», основанных, в частности, на нерцепиционной рекомбинации их участков [206, 207], может происходить отмена ограничения на число делений – «иммортализация» (приобретение бессмертия) [201, 202, 208, 209]. Об этом свидетельствуют две группы фактов: а) в отличие от нормальных тканей человека в клетках большинства опухолей, как и в стволовых клетках, теломераза активна [201, 208–210] и б) трансдукция векторов, экспрессирующих каталитическую субъединицу теломеразы (TERT), увеличивает продолжительность жизни нормальных человеческих клеток некоторых линий по крайней мере еще на 20 делений [211, 212].

Недавно обнаружено, что активность теломеразы контролируется онкобелком Мус, повышающим транскрипцию гена TERT [212] – субъединицы, уровень экспрессии которой определяет активность фермента в нормальных клетках [211, 212]. Интересно, что ряд других клеточных и вирусных онкобелков (активирован-

ный Ras, Mdm2, циклин D1, Cdc25A, E7 HPV) не активирует теломеразу [212], тогда как E6 HPV16 обладает такой способностью [213], причем она связана именно со способностью этого вирусного белка повышать экспрессию Мус [212]. Не исключено, что активизация теломеразы в стимулированных митогенами лимфоцитах, а также в пролиферативных зонах волосяных фолликулов и кишечных крипт (см. обзор [209]) также обусловлена экспрессией в них белка Мус [212]. (Заметим, что в культурах пролиферирующих нормальных клеток теломеразы, как правило, неактивна [201, 210].)

Однако одной только активизации механизмов, препятствующих укорочению теломер, по-видимому, недостаточно для иммортализации клеток. Так, трансдукция TERT или E6, снимая ограничения числа клеточных делений в клетках некоторых линий, тем не менее не приводит к иммортализации фибробластов IMR-90 [212], кератиноцитов и эпителиальных клеток молочной железы [214], хотя и вызывает в них активацию теломеразы и удлинение теломер. Иммортализация таких клеток наступает лишь в случае дополнительной инактивации функции определенных опухолевых супрессоров [201]. Причем, для разных типов клеток требуется, по-видимому, инактивация разных супрессоров [208]. Так, иммортализация человеческих кератиноцитов и эпителиоцитов молочной железы наблюдается при трансдукции TERT и одновременной инактивации либо pRb, либо p16<sup>INK4a</sup>, тогда как элиминация p53 или p19<sup>ARF</sup> не вызывает такого эффекта [214]. С другой стороны, в мышиных клетках, в большинстве которых в отличие от человеческих теломераза конститутивно активирована [215], к иммортализации, как правило, приводит именно инактивация p53 или p19<sup>ARF</sup> (см. обзор [13]), хотя их преждевременное старение (кстати, как и человеческих клеток) может быть вызвано повышением активности любого из упомянутых опухолевых супрессоров – p53, p19<sup>ARF</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, pRb, а также p21<sup>WAF1</sup> [216–219].

Конститутивная активация теломеразы во многих типах нормальных клеток мыши и большой исходный размер их теломер (20 тыс. пар оснований (т.п.о.), тогда как в клетках человека их длина колеблется от 5 до 15 т.п.о.) могут объяснить повышенную способность мышиных клеток иммортализоваться и трансформироваться под действием различных канцерогенных факторов. Если исходить из этого, то весьма вероятно, что и стволовые пролиферирующие клетки, в которых также конститутивно активирована теломераза, могут быть более, чем дифференцированные клетки, подвержены неопластической трансформации.



В последнее время широко обсуждалась возможность использования потенциальных ингибиторов теломеразы для терапии опухолей. Однако серия работ с трансгенными мышами, у которых «нокаутирован ген» РНК-субъединицы теломеразы, принесла неожиданные результаты, ставящие под сомнение такой способ лечения (см. обзор [219]). Как известно, в репликативном старении существуют две фазы: так называемый «ранний кризис» (связан с активацией p53 и/или ингибиторов Cdk, возможно, в ответ на укорочение теломер до какого-то критического размера или какие-то другие сигналы) и так называемая «генетическая катастрофа» (очевидно, обусловлена полной дисфункцией теломер и слипанием хромосом). Оказалось, что при инактивации p53 (отметим, что это характерно для большинства различных новообразований) «ранний кризис», несмотря на «нокаут» теломеразы и укорочение теломер, не наблюдается. В то же время блокирование теломеразы в таких клетках еще больше увеличивает генетическую нестабильность. При этом «генетическая катастрофа» в таких клетках (во всяком случае мышинных) не наступает, так как, вероятно, включаются альтернативные механизмы удлинения теломер. В результате инактивация гена теломеразы у мышей (обычных или с дополнительным нокаутом гена p53) приводит не к предотвращению развития новообразований, а к увеличению частоты их возникновения [219]. В то же время у мышей с нокаутом опухолевого супрессора *Ink4a* при дополнительном нокауте гена теломеразы наблюдалось снижение частоты возникновения опухолей. В связи с этим не исключено, что блокирование теломеразы сможет оказать терапевтический эффект в отношении некоторых опухолей, в частности сохранивших функцию p53 [219].

## 8. ОНКОГЕНЫ, ОПУХОЛЕВЫЕ СУПРЕССОРЫ И НАРУШЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

Нарушения клеточной дифференцировки – характерная черта опухолевых клеток, широко используемая для диагностики новообразований. Особенно ярко она проявляется в гемобластозах, при которых клоны клеток оказываются как бы «замороженными» на той или иной стадии созревания. Общепринятым является представление, согласно которому меньшая зрелость лейкозных клеток является не следствием дедифференцировки зрелых клеток, претерпевших неопластическую трансформацию, а отражает их происхождение из незрелых клеток, в которых блокированы процессы дальнейшей

дифференцировки (рис. 9) (подробнее – см. статью Г.И. Абелева в этом же номере журнала). Это положение получило весьма веские экспериментальные доказательства: при трансдукции химерного гена *PML/RAR-α* (его образование ответственно за развитие острого промиелоцитарного лейкоза, табл. 1), как и некоторых других онкогенов (*MYC*, *MYB*, *v-erbA*), незрелые гемопоэтические клетки-реципиенты действительно теряют способность дифференцироваться под воздействием ретиноевой кислоты, специфических цитокинов и других индукторов созревания [76, 220–222]. При этом интересно, что экспрессия белка *PML/RAR-α* препятствует не только миелоидной, но и мегакариоцитарной дифференцировке, индуцируемой в соответствующих клетках-предшественниках тромбопоэтином [222].

Следует заметить, однако, что остановки дифференцировки недостаточно, чтобы развился лейкоз. Об этом свидетельствует, в частности, тот факт, что онкоген *v-erbA* (кодирует перестроенный ядерный рецептор тиреоидных гормонов, обладающий доминантно-негативным эффектом), связываясь со специфическими респонсивными элементами ряда генов, полностью блокирует образование эритроцитов из эритробластов, но тем не менее не вызывает развитие эритробластоза. Это заболевание возникает лишь в случае одновременной стимуляции пролиферации эритробластов, вызываемой, например, дополнительной экспрессией в них онкогенов, запускающих *Ras-Raf-MAP*-киназные каскады и/или активацию транскрипционных комплексов *AP-1* [220].

Более того, блок дифференцировки – не обязательное условие для опухолевого роста, даже в случае лейкозов. Так, хронический миелоидный лейкоз является результатом хромосомной транслокации в незрелой некоммутированной клетке, приводящей к экспрессии в ней химерного белка *p210<sup>BCR/ABL</sup>*. Экспрессия этого белка стимулирует пролиферацию и подавляет апоптоз (см. раздел 2), что ведет к увеличению числа (иногда очень значительному) вполне зрелых миелоидных клеток. Интересно, что потомками клетки-родоначальницы лейкоза наряду с миелоидными могут быть и зрелые клетки других рядов дифференцировки, в частности лимфоциты и гистиоциты [223, 224]. В то же время следует подчеркнуть, что хронический миелоидный лейкоз течет довольно доброкачественно и приобретает истинно злокачественный характер только тогда, когда в результате дополнительных генетических изменений возникает клон, в котором дифференцировка блокирована (так называемый «бластный криз»).

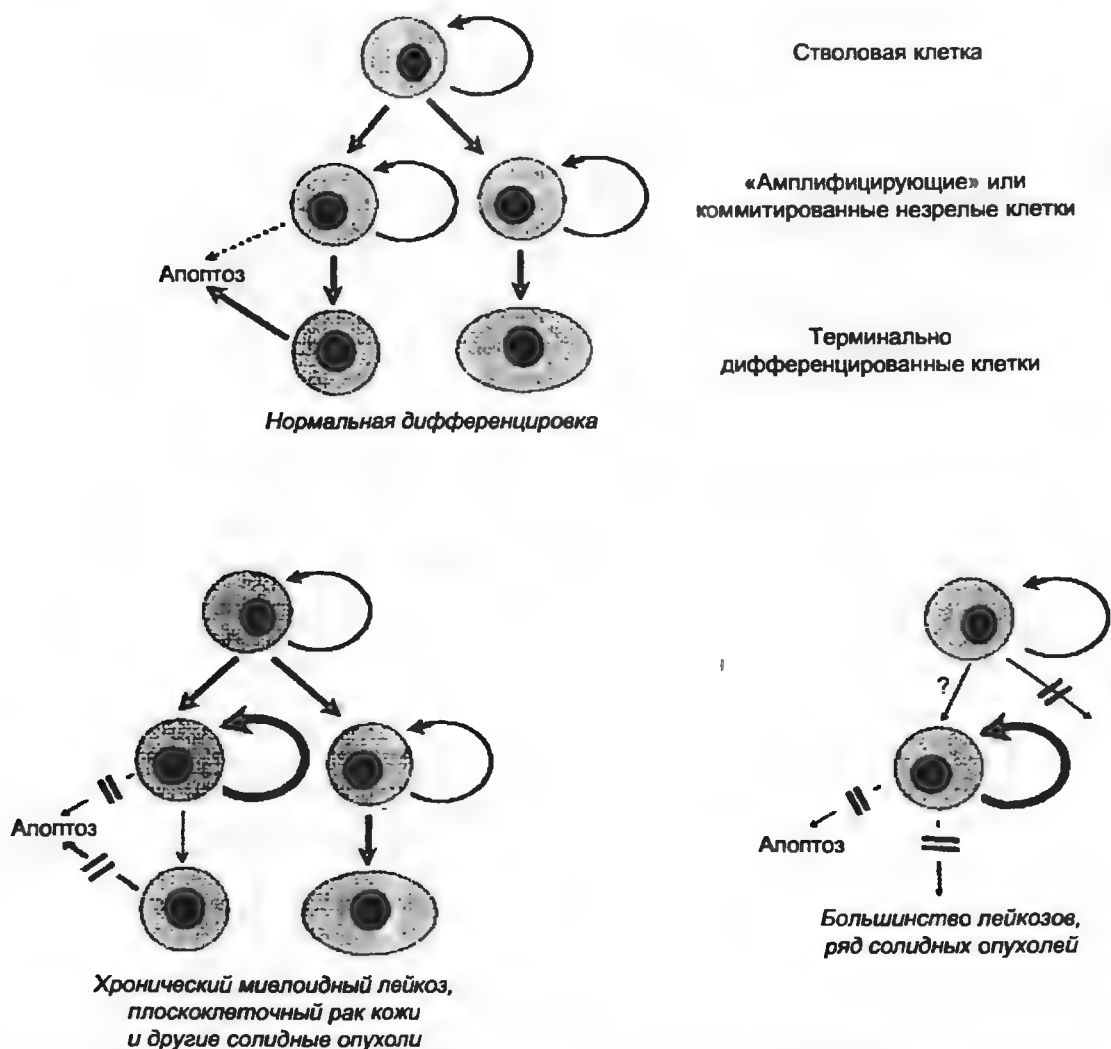


Рис. 9. Модели, объясняющие происхождение новообразований из незрелых клеток определенной стадии дифференцировки, в которых либо сохранена, либо блокирована способность к дальнейшему созреванию (объяснения в тексте)

Сохранение способности к дифференцировке наблюдается и во многих солидных опухолях, причем в отличие от лейкозов созревание клеток не препятствует приобретению злокачественного фенотипа. Примерами этого могут служить плоскоклеточные ороговевающие раки кожи и высокодифференцированные аденокарциномы толстой кишки, происходящие, вероятно, либо из так называемых «амплифицирующих» клеток (потомков стволовых клеток, которые сначала несколько раз делятся, а затем дифференцируются), либо из коммитированных незрелых клеток [225]. Следует подчеркнуть, что происхождение из незрелых клеток не противоречит представлению о том, что опухолевые клетки в ходе прогрессии могут претерпевать опре-

деленную ледифференцировку, утрачивая в первую очередь те дифференцировочные маркеры, отсутствие которых придает клеткам селективные преимущества (рецепторы стероидных гормонов в раках молочной железы и др.). С другой стороны, как справедливо отмечают Г.И. Абелев и С. Селл [226], полной потери признаков тканевой принадлежности в опухолях практически никогда не наблюдается, что может объясняться некоторыми из онкогенов или других генов, функционирование которых необходимо для поддержания неопластической трансформации.

Если экспрессия онкогенов способна блокировать процессы дифференцировки, то активация опухолевых супрессоров, наоборот, может

индуцировать созревание клеток. Так, описана зависимость интенсивности В-клеточной, эритроидной, энтероцитарной, эпидермальной, мышечной и ряда других дифференцировок от активности p53 [227–230], p21<sup>WAF1</sup> [231–234] и pRb [235]. Предполагается, что стимуляция супрессорными белками дифференцировки связана в первую очередь с их способностью вызывать остановку клеточного цикла в G0/G1, что является необходимым условием для созревания многих типов клеток [236]. Впрочем, не исключена вовлеченность и каких-то дополнительных механизмов. Так, p53 как транскрипционный фактор может активировать экспрессию генов, продукты которых входят в набор той или иной специфической дифференцировки.

Можно было бы предположить, что действие онкогенов на дифференцировку также в основном связано с изменениями регуляции клеточной пролиферации. Однако вызываемые ими эффекты не столь однозначны. Во-первых, необходимо отметить, что они сильно зависят от тканевой принадлежности клеток. Так, известно, что активированный Ras или Мус стимулируют пролиферацию и вызывают блок дифференцировки во многих типах клеток. Однако их экспрессия в моноблестах ведет к ингибированию размножения и стимуляции перехода в моноциты [237]. Конститутивная экспрессия Мус промотирует у трансгенных животных и терминальную дифференцировку кератиноцитов, стимулируя деление и переход стволовых клеток в «амплифицирующие» [225].

Во-вторых, механизмы действия онкогенов на дифференцировку не исчерпываются, очевидно, их влиянием на пролиферацию. Например, Sp1 (PU.1) – член семейства транскрипционных факторов Ets – принадлежит к категории так называемых «генов-властителей» («master genes») дифференцировки, регулирующих активность большого набора генов, детерминирующих коммитирование и дальнейшее созревание клеток в том или ином направлении. Активность Sp1, ответственная, кстати, и за активацию супрессора пролиферации p21<sup>WAF1</sup> при действии различных дифференцировочных стимулов [238], предопределяет миелоидную дифференцировку клеток, а извращение функции этого белка в некоммитированных гемопоэтических клетках приводит к развитию эритролейкозов [76]. Лейкозогенное действие онкобелков Myb, вызывающих блок дифференцировки в незрелых миелоидных клетках, связано, по-видимому, с разобщением механизмов регуляции пролиферации клеток и экспрессии в них группы дифференцировочных белков. Продукт протоонкогена MYB, являясь транскрипционным

фактором, непосредственно активирует транскрипцию генов миелопероксидазы, эластазы нейтрофилов, CD34, CD13 и т.д. [76, 221]. Однако его онкогенные производные в результате перестройки утрачивают такую функцию, сохраняя при этом антиапоптотические активности (белок c-Myb трансктивирует ген *BCL2*) и способность промотировать вход в S-фазу [221].

Завершая данный раздел, надо отметить, что механизмы регуляции клеточной дифференцировки являются наименее изученным аспектом действия онкогенов и опухолевых супрессоров. Вероятно, в ближайшие годы эта проблема будет привлекать к себе самое пристальное внимание исследователей.

Итак, канцерогенез – многоступенчатый процесс накопления мутаций и других генетических изменений, приводящих к нарушениям регуляции клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки, морфогенетических реакций клетки, а также, вероятно, к неэффективному функционированию факторов специфического и неспецифического противоопухолевого иммунитета. Только совокупность таких изменений, приобретаемая, как правило, в результате довольно длительной эволюции неопластических клонов, в ходе которой происходит отбор клеток с необходимыми признаками, может обеспечить развитие злокачественного новообразования. Вероятность возникновения в одной клетке нескольких генетических изменений резко повышается при нарушениях работы систем, контролирующих целостность генома. Поэтому мутации, ведущие к генетической нестабильности, также являются неотъемлемым этапом опухолевой прогрессии. Более того, некоторые врожденные аномалии систем генетического контроля являются фактором, предопределяющим неизбежное возникновение новообразования: они настолько увеличивают вероятность появления в каждой клетке организма различных онкогенных мутаций, что у индивидуума раньше или позже в какой-то из клеток пролиферирующего клона под давлением отбора обязательно накопится необходимая совокупность изменений и образуется опухоль.

Ключевую роль в возникновении указанных свойств неопластической клетки играют нарушения функции опухолевых супрессоров и протоонкогенов. Исследования последних лет позволили идентифицировать сигнальные пути, контролируемые большинством этих генов. Выяснилось, что многие из них регулируют активность одних и тех же путей на разных этапах передачи сигналов. Оказалось также, что некоторые из таких сигнальных путей одновременно вовлечены в регуляцию нескольких важнейших фи-

зиологических процессов. Например, активация Raf-МАР-киназного каскада не только стимулирует вход в S-фазу, но и вызывает изменения формы и подвижности клеток, а в некоторых клеточных контекстах – также и подавление апоптоза. С другой стороны, продукты некоторых из опухолевых супрессоров и протоонкогенов являются местами пересечения различных сигнальных путей. Так, p53, активируясь в ответ на самые разные повреждающие, стрессорные и нормальные регуляторные воздействия, взаимодействует с различными мишенями и контролирует апоптоз, продвижение по клеточному циклу, стабильность генома, морфогенетические реакции и дифференцировку клеток. Белки Ras, активируя свои мишени – Raf, PI3K, RalGDS, играют ключевую роль в регуляции деления, выживаемости и дифференцировки клеток, их взаимодействия с внеклеточным матриксом и локомоции. Отсюда становится понятной частая встречаемость изменений генов p53 и RAS в самых разных новообразованиях – их мутации позволяют за один шаг преодолеть несколько важных этапов опухолевой прогрессии и придать неопластической клетке сразу несколько необходимых свойств.

В то же время для ряда новообразований, и в первую очередь для лейкозов, характерны генетические изменения, встречающиеся только при данном заболевании. К ним относятся прежде всего хромосомные транслокации, перемещающие протоонкогены и/или опухолевые супрессоры в другое место генома. Специфичность таких изменений объясняется, по-видимому, тремя основными причинами. Во-первых, в определенных типах клеток может быть значительно повышена вероятность некоторых генетических перестроек. Так, в ходе дифференцировки В-лимфоцитов происходит запрограммированная перестройка генов иммуноглобулинов. Закономерной ошибкой таких перестроек являются хромосомные транслокации, соединяющие гены им-

муноглобулинов с протоонкогеном MYC, содержащим в своем составе специфические сигнальные последовательности, которые распознаются рекомбиназами, осуществляющими перестройку генов иммуноглобулинов. Естественно предположить, что в предшественниках В-лимфоцитов такие транслокации, нарушающие нормальную регуляцию белка Мус, происходят чаще, чем другие мутации, приводящие к сходным биологическим последствиям. Во-вторых, тканеспецифичными могут быть экспрессия или действие определенных онкогенов/опухолевых супрессоров. И, в-третьих, для приобретения злокачественного фенотипа разные типы клеток могут нуждаться в неодинаковых наборах биологических свойств. Так, для гемопоэтических клеток по сравнению с клетками других тканей менее существенным представляется приобретение таких признаков, как потеря контактного торможения размножения и локомоторный фенотип. Определяющими для их злокачественной трансформации являются, по-видимому, стимуляция пролиферации, подавление апоптоза и блокирование специфической дифференцировки. Поэтому при развитии гемобластозов особой селективной ценностью обладают, очевидно, перестройки типа *PML/RAR $\alpha$* , способные сразу придавать клеткам некоторых типов эти три важнейших свойства.

Несмотря на достигнутый в последние годы значительный прогресс в понимании базовых механизмов канцерогенеза, много вопросов остаются неясными. Среди них важное место занимают механизмы тканеспецифического действия онкогенов и опухолевых супрессоров. Можно думать, что исследование этой проблемы станет в ближайшее время одной из наиболее бурно развивающихся областей онкологии.

Автор выражает благодарность Ю.А. Ровенскому и Г.И. Абелеву за критическое чтение рукописи и стимулирующие дискуссии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bishop, J.M. (1991) *Cell*, **64**, 235–248.
2. Levine, A.J. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 623–651.
3. Rabbitts, T.H. (1994) *Nature*, **72**, 143–149.
4. Weinberg, R.A. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **758**, 331–338.
5. Hunter, T. (1997) *Cell*, **88**, 333–346.
6. Hooper, M.L. (1998) *EMBO J.*, **17**, 6783–6789.
7. Dyson, N., Buchkovich, K., Whyte, P., and Harlow, E. (1989) *Princess Takamatsu Symp.*, **20**, 191–198.
8. Sugden, B. (1993) *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 233–235.
9. Hoppe-Seyler, F., and Butz K. (1995) *J. Mol. Med.*, **73**, 529–538.
10. Flint, J., and Shenk, T. (1997) *Annu. Rev. Genet.*, **31**, 177–212.
11. Scarpa, A., and Tognon, M. (1998) *Int. J. Mol. Med.*, **1**, 1011–1023.
12. Sanchez-Garcia, I. (1997) *Annu. Rev. Genet.*, **31**, 429–453.
13. Sherr, C.J. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 2984–2991.
14. Prives, C. (1998) *Cell*, **95**, 5–8.
15. Ruas, M., and Peters, G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1378**, F115–F177.
16. Morgan, D.O. (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 261–291.
17. Mittnacht, S. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 21–27.
18. Helin, K. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 28–35.
19. Porter, A.C., and Vaillancourt, R.R. (1998) *Oncogene*, **17**, 1343–1352.
20. Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., and Der, C.J. (1998) *Oncogene*, **17**, 1395–1414.

21. Pawson, T., and Saxton, T. (1999) *Cell*, **97**, 675–678.
22. Dhanasekaran, N., and Reddy, E.P. (1998) *Oncogene*, **17**, 144–145.
23. Galaktionov, K., Chen, X., and Beach, D. (1996) *Nature*, **382**, 511–517.
24. Alevizopoulos, K., Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. (1997) *EMBO J.*, **17**, 5322–5333.
25. Fashini, L.M., and Penn, L.Z. (1998) *FASEB J.*, **12**, 633–651.
26. Dang, C.V. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1–11.
27. Sherr, C.J. (1996) *Science*, **274**, 1672–1677.
28. Giaccia, A.J., and Kastan, M.B. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 2973–2983.
29. Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G., and Haber, D.A. (1995) *Genes Dev.*, **9**, 2143–2156.
30. Ouchi, T., Monteiro, A.N.A., August, A., Aaronson, S.A., and Hanafusa, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2302–2306.
31. Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Zhang, H., Bi, D., Weber, B.L., and El-Deiry, W.S. (1998) *Oncogene*, **16**, 1713–1721.
32. Garkavtsev, I., Grigorian, I.A., Ossovskaya, V.S., Chernov, M.V., and Gudkov, A.V. (1998) *Nature*, **391**, 295–298.
33. Englert, C., Maheswaran, S., Garvin, A.J., Kreidberg J., and Haber, D.A. (1997) *Cancer Res.*, **57**, 1429–1434.
34. Datto, M.B., Hu, P.P., Kowalik, T.F., Yingling, J., and Wang, X.F. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2030–2037.
35. Grau, A.M., Zhang, L., Wang, W., Ruan, S., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Zhang, W., and Chiao, P.J. (1997) *Cancer Res.*, **57**, 3929–3934.
36. Miyazaki, M., Ohashi, R., Tsuji, T., Mihara, K., Gohda, E., and Namba, M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 873–880.
37. Massague, J., and Polyak, K. (1995) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 91–96.
38. Sun, P., Dong, P., Dai, K., Hannon, G.J., and Beach, D. (1998) *Science*, **282**, 2270–2272.
39. Xiao, Z.X., Chen, J., Levine, A.J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W.R., and Livingston, D.M. (1995) *Nature*, **375**, 694–698.
40. Derynck, R., Zhang, Y., and Feng, X.-H. (1998) *Cell*, **95**, 737–740.
41. Kretschmar, M., and Massague, J. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 103–111.
42. Bullions, L.C., and Levine, A.J. (1998) *Curr. Opin. Oncol.*, **10**, 81–87.
43. Tetsu, O., and McCormick, F. (1999) *Nature*, **398**, 422–426.
44. He, T.-C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998) *Science*, **281**, 1509–1512.
45. Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. (1997) *Science*, **275**, 1790–1792.
46. Polakis, P. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1332**, F127–F147.
47. Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997) *Science*, **275**, 1787–1790.
48. Willert, K., and Nusse, R. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 95–102.
49. Green, D.R. (1998) *Cell*, **94**, 695–698.
50. Evan, G., and Littlewood, T. (1998) *Science*, **281**, 1317–1322.
51. Dragovich, T., Rudin, C.M., and Thompson, C.B. (1998) *Oncogene*, **17**, 3207–3213.
52. Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., and Inohara, N. (1998) *Oncogene*, **17**, 3237–3245.
53. Adams, J.M., and Cory, S. (1998) *Science*, **281**, 1322–1326.
54. Chao, D.T., and Korsmeyer, S.J. (1998) *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 395–419.
55. Reed, J.C. (1998) *Oncogene*, **17**, 3225–3236.
56. Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B., and Stark, G.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 1–4.
57. Amundson, S.A., Myers, T.G., and Fornace, A.J., Jr. (1998) *Oncogene*, **17**, 3287–3299.
58. Nikiforov, M.A., Hagen, K., Ossovskaya, V.S., Connor, T.M.F., Lowe, S.W., Deichman, G.I., and Gudkov, A. (1996) *Oncogene*, **13**, 1709–1719.
59. Ko, L.J., and Prives, C. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 1054–1072.
60. Polyak, K., Xia, Y., Zweller, J.L., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997) *Nature*, **389**, 300–306.
61. Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., III, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G., and El-Deiry, W.S. (1997) *Nat. Genet.*, **17**, 141–143.
62. Sheikh, M.S., Burns, T.F., Huang, Y., Wu, G.S., Amundson, S., Brooks, K.S., Fornace, A.J. Jr., and El-Deiry, W.S. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 1593–1598.
63. Downward, J. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 49–54.
64. Jarpe, M.B., Widmann, C., Knall, C., Schlesinger, T.K., Gibson, S., Yujiri, T., Fanger, G.R., Gelfand, E.W., and Johnson, G.L. (1998) *Oncogene*, **17**, 1475–1482.
65. Khwaja, A. (1999) *Nature*, **401**, 33–34.
66. LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., and MacKenzie, A.E. (1998) *Oncogene*, **17**, 3247–3259.
67. Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Mayo, M.W., and Baldwin, A.S. Jr. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5923–5929.
68. Marsh, D.J., Coulon, V., Lunetta, K.L., Rocca-Serra, P., Dahia, P.L., Zheng, Z., Liaw, D., Caron, S., Duboue, B., Lin, A.Y., Richardson, A.L., Bonnetblanc, J.M., Bressieux, J.M., Cabarrot-Moreau, A., Chompret, A., Demange, L., Eeles, R.A., Yahanda, A.M., Fearon, E.R., Fricker, J.P., Gorlin, R.J., Hodgson, S.V., Huson, S., Lacombe, D., and Eng, C. (1998) *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 507–515.
69. Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1998) *Cell*, **95**, 29–39.
70. Gotoh, A., and Broxmeyer, H.E. (1997) *Curr. Opin. Hematol.*, **4**, 3–11.
71. Amarante-Mendes, G.P., McGahon, A.J., Nishioka, W.K., Afar, D.E., Witte, O.N., and Green, D.R. (1998) *Oncogene*, **16**, 1383–1390.
72. Kramer, A., Horner, S., Willer, A., Fruehauf, S., Hochhaus, A., Hallek, M., and Hehlmann, R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2087–2092.
73. Yuan, Z.M., Huang, Y., Ishiko, T., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1437–1440.
74. Huang, Y., Yuan, Z.M., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kato, T., Kharbanda, S., and Kufe, D.W. (1997) *Oncogene*, **15**, 1947–1952.
75. Kharbanda, S., Yuan, Z.-M., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1998) *Oncogene*, **17**, 3309–3318.
76. Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D., and Zhang, D.-E. (1997) *Blood*, **90**, 489–519.
77. Quignon, F., de Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J.C., and de The, H. (1998) *Nat. Genet.*, **20**, 259–265.
78. Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., and Pandolfi, P.P. (1998) *Nat. Genet.*, **20**, 266–272.
79. Wang, Z.G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F., and Pandolfi, P.P. (1998) *Science*, **279**, 1547–1551.
80. Cleaver, J.E. (1968) *Nature*, **218**, 652–656.
81. Bol, S.A., van Steeg, H., Jansen, J.G., van Oostrom, C., de Vries, A., de Groot, A.J., Tate, A.D., Vrieling, H., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 2850–2856.



82. De Vries, A., Dolle, M.E., Broekhof, J.L., Muller, J.J., Kroese, E.D., van Kreijl, C.F., Capel, P.J., Vijg, J., and van Steeg, H. (1997) *Carcinogenesis*, **18**, 2327–2332.
83. Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997) *Nature*, **396**, 643–649.
84. Lynch, H.T., Lemon, S.J., Karr, B., Franklin, B., Lynch, J.F., Watson, P., Tinley, S., Lerman, C., and Carter, C. (1997) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **6**, 987–991.
85. Lynch, H.T., Fusaro, R.M., and Lynch, J.F. (1997) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **833**, 1–28.
86. Angioli, R., Estape, R., Mason, M., and Penalver, M. (1998) *Int. J. Oncol.*, **12**, 1029–1034.
87. Kolodner, R. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 1433–1442.
88. Blackwood, M.A., and Weber, B.L. (1998) *J. Clin. Oncol.*, **16**, 1969–1977.
89. Bertwistle, D., and Ashworth, A. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 14–20.
90. Marmorstein, L.Y., Ouchi, T., and Aaronson, S.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13869–13874.
91. Zhang, H., Tomblin, G., and Weber, B.L. (1998) *Cell*, **92**, 433–436.
92. Wang, Q., Zhang, H., Kajino, K., and Greene, M.I. (1998) *Oncogene*, **17**, 1939–1948.
93. Murray, A.W. (1995) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 5–11.
94. Elledge, S.J. (1996) *Science*, **274**, 1664–1672.
95. Murakami, H., and Okayama, H. (1997) *Exp. Mol. Med.*, **29**, 1–11.
96. Paulovich, A.G., Toczyski, D.P., and Hartwell, L.H. (1997) *Cell*, **88**, 315–322.
97. Lanni, J.S., and Jacks, T. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1055–1064.
98. Sablina, A., Ilyinskaya, G., Rubtsova, S., Agapova, L., Chumakov, P., and Kopnin, B. (1998) *J. Cell Science*, **111**, 977–984.
99. Khan, S.H., and Wahl, G.M. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 396–401.
100. Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 2540–2551.
101. Linke, S.P., Clarkin, K., Di Leonardo, A., Tsou, A., and Wahl, G.M. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 934–947.
102. Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Chernova, O., Sharma, Y., and Stark, G.R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14775–14780.
103. Taylor, W.R., Agarwal, M., Agarwal, A., Stacey, D.W., and Stark, G.R. (1999) *Oncogene*, **18**, 283–295.
104. Rudner, A.D., and Murray, A.W. (1996) *Curr Opin Cell Biol.*, **8**, 773–80.
105. Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K.V., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998) *Nature*, **392**, 300–303.
106. Orr-Weaver, T.L., and Weinberg, R.A. (1998) *Nature*, **392**, 223–224.
107. Linke, S.P., Harris, M.P., Neugebauer, S., Clarkin, K., Shepard, H.M., Maneval, D.C., and Wahl, G.M. (1997) *Oncogene*, **15**, 337–345.
108. Levine, A.J. (1997) *Cell*, **88**, 323–331.
109. Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S., and Vande Woude, G.F. (1996) *Science*, **271**, 1744–1747.
110. Harvey, M., Sands, A.T., Weiss, R.S., Heig, M.E., Wiseman, R.W., Pantazis, P., Clovanello, B.O., Tainsky, M.A., Bradley, A., and Donehower, L.A. (1993) *Oncogene*, **8**, 2456–2467.
111. Agapova, L.S., Ilyinskaya, G.V., Turovets, N.A., Ivanov, A.V., Chumakov, P.M., and Kopnin, B.P. (1996) *Mut. Res.*, **354**, 129–138.
112. Fukasawa, K., Wiener, F., Woud, G.F.V., and Mai, S. (1997) *Oncogene*, **15**, 1295–1302.
113. Lee, J.M., Abrahamson, L.A., Kandel, R., Donehower, L.A., and Bernstein, A. (1994) *Oncogene*, **9**, 3731–3736.
114. Livingstone, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T., and Tlsty, T.D. (1992) *Cell*, **70**, 923–935.
115. Yin, Y., Tainsky, M.A., Bishoff, F.Z., Strong, L.C., and Wahl, G.M. (1992) *Cell*, **70**, 937–948.
116. Ильинская Г.В., Пугачева Е.Н., Сокова О.И., Чумаков П.М., Копнин Б.П. (1995) *Генетика*, **31**, 622–627.
117. Agapova, L.S., Ivanov, A.V., Sablina, A.A., Kopnin, B.P., Sokova, O.I., Chumakov, P.M., and Kopnin, B.P. (1999) *Oncogene*, **18**, 3135–3142.
118. Ровенский Ю.А. (1998) *Биохимия*, **63**, 1204–1221.
119. Dietrich, C., Wallenhan, C., Oesch, F., and Wieser, R. (1997) *Oncogene*, **15**, 2743–2747.
120. Wieser, R.J., Faust, D., Dietrich, C., and Oesch, F. (1999) *Oncogene*, **18**, 277–281.
121. St. Croix, B., Sheehan, C., Rak, J.W., Florenes, V.A., Slingerland, J.M., and Kerbel, R.S. (1998) *J. Cell. Biol.*, **142**, 557–571.
122. Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A., and Reeve, A.E. (1998) *Nature*, **392**, 402–405.
123. Tlsty, T.D. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 647–653.
124. Rapp, L., and Chen, J.J. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1378**, F1–F19.
125. Fang, F., Orend, G., Watanabe, N., Hunter, T., and Ruoslahti, E. (1996) *Science*, **271**, 499–502.
126. Kumar, C.C. (1998) *Oncogene*, **17**, 1365–1374.
127. Wu, R.C., and Schonthal, A.H. (1997) *J. Biol. Chem.*, **14**, 29091–29098.
128. Kawada, M., Yamagoe, S., Murakami, Y., Suzuki, K., Mizuno, S., and Uehara, Y. (1997) *Oncogene*, **15**, 629–637.
129. Tanimura, S., Chatani, Y., Hoshino, R., Sato, M., Watanabe, S., Kataoka, T., Nakamura, T., and Kohno, M. (1998) *Oncogene*, **17**, 57–65.
130. Khwaja, A., Lehmann, K., Marte, B.M., and Downward, J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 18793–18801.
131. Herrera, R. (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 1039–1049.
132. Potempa, S., and Ridley, A.J. (1998) *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 2185–2200.
133. Taylor, G.A., Jeffers, M., Webb, C.P., Koo, H.M., Anver, M., Sekiguchi, K., and Vande Woude, G.F. (1998) *Oncogene*, **17**, 1179–1183.
134. Jeffers, M., Fiscella, M., Webb, C.P., Anver, M., Koochekpour, S., and Vande Woude, G.F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14417–14422.
135. Anand-Apte, B., and Zetter, B. (1997) *Stem Cells*, **15**, 259–267.
136. Graf, K., Xi, X.P., Yang, D., Fleck, E., Hsueh, W.A., and Law, R.E. (1997) *Hypertension*, **29**, 334–339.
137. Adam, L., Vadlamudi, R., Kondapaka, S.B., Chernoff, J., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 28238–28246.
138. Choudhury, G.G., Karamitsos, C., Hernandez, J., Gentilini, A., Bardgett, J., and Aboud, H.E. (1997) *Am. J. Physiol.*, **273**, 931–938.
139. Xie, H., Pallero, M.A., Gupta, K., Chang, P., Ware, M.F., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Lauffenburger, D.A., Murphy-Ullrich, J.E., and Wells, A. (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 615–624.
140. Gloushankova, N.A., Alieva, N.A., Krendel, M.F., Bonder, E.M., Feder, H.H., Vasiliev, J.M., and Gelfand, I.M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8597–8601.
141. Gloushankova, N., Ossovskaya, V., Vasiliev, J., Chumakov, P., and Kopnin, B. (1997) *Oncogene*, **16**, 536–539.
142. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997) *Cell*, **88**, 593–602.
143. Zohn, I., Campbell, S., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., and Der, C.J. (1998) *Oncogene*, **17**, 1415–1438.
144. Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A., and Downward, J. (1997) *Cell*, **89**, 457–467.

145. He, H., Watanabe, T., Zhan, X., Huang, C., Schuurin, E., Fukami, K., Takenawa, T., Kumar, C.C., Simpson, R.J., and Maruta, H. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3829–3837.
146. Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Clark, G.J., Kinch, M.S., and Der, C.J. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6443–6453.
147. Khosravi-Far, R., White, M.A., Westwick, J.K., Solski, P.A., Chrzanowska-Wodnicka, M., van Aelst, L., Wigler, M.H., and Der, C.J. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3923–3933.
148. Okazaki, K., and Sagata, N. (1995) *Oncogene*, **10**, 1149–1157.
149. Oldham, S.M., Clark, G.J., Gangarosa, L.M., Coffey, R.J. Jr., and Der, C.J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6924–6928.
150. Greulich, H., and Erikson, R.L. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 13280–13288.
151. Topol, L.Z., Marx, M., Calothy, G., and Blair, D.G. (1995) *Cell Growth Differ.*, **6**, 27–38.
152. Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 2295–2322.
153. Cobellis, G., Missero, C., and di Lauro, R. (1998) *Oncogene*, **17**, 2047–2057.
154. Okuno, H., Suzuki, T., Yoshida, T., Hashimoto, Y., Curran, T., and Iba, H. (1991) *Oncogene*, **6**, 1491–1497.
155. Ljungdahl, S., Linder, S., Franzen, B., Binetruy, B., Auer, G., and Shoshan, M.C. (1998) *Cell Growth Differ.*, **9**, 565–573.
156. Dong, Z., Lavrovsky, V., and Colburn, N.H. (1995) *Carcinogenesis*, **16**, 749–756.
157. Malliri, A., Symons, M., Hennigan, R.F., Hurlstone, A.F., Lamb, R.F., Wheeler, T., and Ozanne, B.W. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 1087–1099.
158. Li, J., Hu, S.X., Perng, G.S., Zhou, Y., Xu, K., Zhang, C., Seigne, J., Benedict, W.F., and Xu, H.J. (1996) *Oncogene*, **13**, 2379–2386.
159. Folkman, J. (1995) In *The Molecular Basis of Cancer* (Mendelson, J., Howley, P.M., Israel, M.A., and Liotta, L.A., eds), W.B. Saunders Press, N.Y., pp. 206–232.
160. Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A., and Bouck, N. (1994) *Science*, **265**, 1582–1584.
161. Adoff, K.W., Liska, D.J., and Bornstein, P. (1997) *Gene*, **193**, 5–11.
162. Sugihara, T., Kaul, S.C., Mitsui, Y., and Wadhwa, R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1224**, 365–370.
163. Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., and Sukhatme, V.P. (1995) *Cancer Res.*, **55**, 6161–6165.
164. Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S., and Giaccia, A.J. (1996) *Nature*, **379**, 88–91.
165. Volpert, O.V., Dameron, K.M., and Bouck, N. (1997) *Oncogene*, **14**, 1495–1502.
166. Grugel, S., Finkenzeller, G., Weindel, K., Barleon, B., and Marme, D. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 25915–25919.
167. Rak, J., Mitsushashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T., and Kerbel, R.S. (1995) *Cancer Res.*, **55**, 4575–4580.
168. Saez, E., Rutberg, S.E., Mueller, E., Oppenheim, H., Smoluk, J., Yuspa, S.H., and Spiegelman, B.M. (1995) *Cell*, **82**, 721–732.
169. Arbiser, J.L., Moses, M.A., Fernandez, C.A., Ghiso, N., Cao, Y., Klauber, N., Frank, D., Brownlee, M., Flynn, E., Parangi, S., Byers, H.R., and Folkman, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 861–866.
170. Meade-Tollin, L.C., Boukamp, P., Fusenig, N.E., Bowen, C.P., Tsang, T.C., and Bowden, G.T. (1998) *Br. J. Cancer*, **77**, 724–730.
171. Giambernardi, T.A., Grant, G.M., Taylor, G.P., Hay, R.J., Maher, V.M., McCormick, J.J., and Klebe, R.J. (1998) *Matrix Biol.*, **16**, 483–496.
172. Himelstein, B.P., Lee, E.J., Sato, H., Seiki, M., and Muschel, R.J. (1997) *Oncogene*, **14**, 1995–1998.
173. Newberry, E.P., Willis, D., Latifi, T., Boudreaux, J.M., and Towler, D.A. (1997) *Mol. Endocrinol.*, **11**, 1129–1144.
174. Christofori, G., and Hanahan, D. (1994) *Semin. Cancer Biol.*, **5**, 3–12.
175. Richards, F.M., Webster, A.R., McMahon, R., Woodward, E.R., Rose, S., and Maher, E.R. (1998) *J. Intern. Med.*, **243**, 527–533.
176. Witzmann-Voos, S., Breier, G., Risau, W., and Plate, K.H. (1995) *Cancer Res.*, **55**, 1358–1364.
177. Seimeister, G., Weindel, K., Mohrs, K., Barleon, B., Martiny-Baron, G., and Marme, D. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 2299–2301.
178. Nikiforov, M.A., Kwek, S.S., Mehta, R., Artwohl, J.E., Lowe, S.W., Gupta, T.D., Deichman, G.I., and Gudkov, A. (1997) *Oncogene*, **15**, 3007–3012.
179. Deichman, G.I., Matveeva, V.A., Kashkina, L.M., Dyakova, N.A., Uvarova, E.N., Nikiforov, M.A., and Gudkov, A.V. (1998) *Int. J. Cancer*, **75**, 277–283.
180. Mashimo, T., Watabe, M., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Tegtmeyer, P.J., Rinker-Shaeffer, C.W., and Watabe, K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11307–11311.
181. Guo, X.Z., Friess, H., di Mola, F.F., Heinicke, J.M., Abou-Shady, M., Graber, H.U., Baer, H.U., Zimmermann, A., Korc, M., and Buchler, M.W. (1998) *Hepatology*, **28**, 1481–1488.
182. Sho, M., Adachi, M., Taki, T., Hashida, H., Konishi, T., Huang, C.L., Ikeda, N., Nakajima, Y., Kanehiro, H., Hisanaga, M., Nakano, H., and Miyake, M. (1998) *Int. J. Cancer*, **79**, 509–516.
183. Huang, C.I., Kohno, N., Ogawa, E., Adachi, M., Taki, T., and Miyake, M. (1998) *Am. J. Pathol.*, **153**, 973–983.
184. Friess, H., Guo, X.Z., Berberat, P., Graber, H.U., Zimmermann, A., Korc, M., and Buchler, M.W. (1998) *Int. J. Cancer*, **79**, 349–355.
185. Higashiyama, M., Kodama, K., Yokouchi, H., Takami, K., Adachi, M., Taki, T., Ishiguro, S., Nakamori, S., Yoshie O., and Miyake, M. (1998) *Cancer*, **83**, 466–474.
186. Gao, A.C., Lou, W., Dong, J.T., and Isaacs, J.T. (1997) *Cancer Res.*, **57**, 846–849.
187. Takaoka, A., Hinoda, Y., Satoh, S., Adachi, Y., Itoh, F., Adachi, M., and Imai, K. (1998) *Oncogene*, **16**, 1443–1453.
188. Takaoka, A., Hinoda, Y., Sato, S., Itoh, F., Adachi, M., Hareyama, M., and Imai, K. (1998) *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 397–404.
189. Sherbet, G.V., and Lakshmi, M.S. (1998) *Anticancer Res.*, **18**, 2415–2421.
190. Ambartsumian, N.S., Grigorian, M.S., Larsen, I.F., Karlstrom, O., Sidenius, N., Rygaard, J., Georgiev, G., and Lukanidin, E. (1996) *Oncogene*, **13**, 1621–1630.
191. Maclandsmo, G.M., Hovig, E., Skrede, M., Engebraaten, O., Florenes, V.A., Myklebost, O., Grigorian, M., Lukanidin, E., Scanlon, K.J., and Fodstad, O. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 5490–5498.
192. Lloyd, B.H., Platt-Higgins, A., Rudland, P.S., and Barraclough, R. (1998) *Oncogene*, **17**, 465–473.
193. Keirsebilck, A., Bonne, S., Bruyneel, E., Vermassen, P., Lukanidin, E., Mareel, M., and van Roy, F. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 4587–4591.
194. Andersen, K., Maclandsmo, G.M., Hovig, E., Fodstad, O., Loennechen, T., and Winberg, J.O. (1998) *Anticancer Res.*, **18**, 3299–3303.
195. Kriajevska, M., Tarabykina, S., Bronstein, I., Maitland, N., Lomonosov, M., Hansen, K., Georgiev, G., and Lukanidin, E. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 9852–9856.
196. Deichman, G.I., Kashkina, L.M., Misenina, O.A., Gorjanskaya, E.G., Nikiforov, M.A., Gudkov, A.V., Dyakova, N.A., Komelkov, A.V., Prilutskaya, M.O., Kushlinsky, N.E., and Tatosyan, A.G. (1996) *Int. J. Cancer*, **66**, 747–752.

197. Deichman, G.I., Kashkina, L.M., Kluchareva, T.E., Matveeva, V.A., Uvarova, E.N., and Burdelya, L.G. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.*, 400A, 473–477.
198. Hayflick, L. (1965) *Exp. Cell. Res.*, 37, 614–636.
199. Дункан Э.Л., Реддел Р.Р. (1997) *Биохимия*, 62, 1477–1490.
200. Вазирн Х. (1997) *Биохимия*, 62, 1528–1533.
201. Shay, J.W. (1997) *J. Cell. Physiol.*, 173, 266–270.
202. Garkavtsev, I., Hull, C., and Riabowol, K. (1998) *Exp. Gerontol.*, 33, 81–94.
203. Olovnikov, A.M. (1973) *J. Theor. Biol.*, 41, 181–190.
204. Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.B. (1990) *Nature*, 345, 458–460.
205. Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K., and Allshire, R.C. (1991) *Nature*, 346, 866–868.
206. Holt, S.E., Wright, W.E., and Shay, J.W. (1997) *Eur. J. Cancer*, 33, 761–766.
207. Реддел Р.Р., Брайан Т.М., Мернейн Д.Р. (1997). *Биохимия*, 62, 1467–1476.
208. Wynford-Thomas, D. (1997) *Eur. J. Cancer*, 33, 716–726.
209. Greider, C.W. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 90–92.
210. Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1992) *EMBO J.*, 11, 1921–1929.
211. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner S., and Wright, W.E. (1998) *Science*, 279, 349–352.
212. Wang, J., Xie, L.Y., Allan, S., Beach, D., and Hannon, G.J. (1998) *Genes Dev.*, 12, 1769–1774.
213. Klingelutz, A.J., Foster, S.A., and McDougall, J.K. (1996) *Nature*, 380, 79–82.
214. Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelutz, A.J. (1998) *Nature*, 396, 84–88.
215. Chadeneau, P., Siegel, P., Harley, C.B., Muller, W.J., and Bacchetti, S. (1995) *Oncogene*, 11, 893–898.
216. Sugrue, M.M., Shin, D.Y., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9648–9653.
217. Xu, H.J., Zhou, Y., Ji, W., Perng, G.S., Kruzelock, R., Kong, C.T., Bast, R.C., Mills, G.B., Li, J., and Hu, S.X. (1997) *Oncogene*, 15, 2589–2596.
218. Vogt, M., Hagblom, C., Yeargin, J., Christiansen-Weber, T., and Haas, M. (1998) *Cell Growth Differ.*, 9, 139–146.
219. De Lange T., and Jacks, T. (1999) *Cell*, 98, 273–275.
220. Stunnenberg, H.G., Garcia-Jimenez, C., and Betz, J.L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1423, F15–F33.
221. Weston, K. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8, 76–81.
222. Testa, U., Grignani, F., Hassan, H.J., Rogaia, D., Masciulli, R., Gelmetti, V., Guerriero, R., Macioce, G., Liberatore, C., Barberi, T., Mariani, G., Pelicci, P.G., and Peschle, C. (1998) *Leukemia*, 12, 563–570.
223. Anastasi, J., Feng, J., Dickstein, J.I., le Beau, M.M., Rubin, C.M., Larson, R.A., Rowley, J.D., and Vardiman, J.W. (1996) *Leukemia*, 10, 795–802.
224. Anastasi, J., Musvec, T., Roulston, D., Damer, P.H., Larson, R.A., and Vardiman, J.W. (1998) *Leukemia*, 12, 233–237.
225. Watt, F.M. (1998) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 353, 831–837.
226. Abelev, G.I., and Sell, S. (1999) *Semin. Cancer Biol.*, 9, 61–65.
227. Rotter, V., Aloni-Grinstein, R., Schwartz, D., Elkind, N.B., Simons, A., Wolkowicz, R., Lavigne, M., Beserman, P., Kapon, A., and Goldfinger, N. (1994) *Semin. Cancer Biol.*, 5, 229–236.
228. Райхлин Н.Т., Володина Ю.Л., Смирнова Е.А., Перовошиков А.Г., Чумаков П.М., Копнин Б.П. (1995) *Архив патол.*, 57, 34–38.
229. Kremenetskaya, O.S., Logacheva, N.P., Baryshnikov, A.Y., Chumakov, P.M., and Kopnin, B.P. (1997) *Oncol. Res.*, 9, 155–166.
230. Shick, L., Carman, J.H., Choi, J.K., Somasundaram, K., Burrell, M., Hill, D.E., Zeng, Y.X., Wang, Y., Wiman, K.G., Salhany, K., Kadesch, T.R., Monroe, J.G., Donehower, L.A., and El-Deiry, W.S. (1997) *Cell Growth Differ.*, 8, 121–131.
231. Steinman, R.A., Hoffman, B., Iro, A., Guillof, C., Liebermann, D.A., and El-Houseini, M.E. (1994) *Oncogene*, 9, 3389–3396.
232. Tron, V.A., Tang, L., Yong, W.P., and Trotter, M.J. (1996) *Am. J. Pathol.*, 149, 1139–1146.
233. Gartel, A.L., Serfas, M.S., Gartel, M., Goufman, E., Wu, G.S., El-Deiry, W.S., and Tyner, A.L. (1996) *Exp. Cell. Res.*, 227, 171–181.
234. Mugita, N., Honda, Y., Nakamura, H., Fujiwara, T., Tanaka, K., Omura, S., Shimbara, N., Ogawa, M., Saya H., and Nakao, M. (1999) *Int. J. Mol. Med.*, 3, 127–137.
235. Stigler, P., Kasten, M., and Giordano, A. (1998) *J. Cell Biochem. Suppl.*, 30–31, 30–36.
236. Alani, R.M., Hasskarl, J., and Munger, K. (1998) *Mol. Carcinog.*, 23, 226–233.
237. Maher, J., Baker, D., Dibb, N., and Roberts, I. (1996) *Leukemia*, 10, 83–90.
238. Nakano, K., Mizuno, T., Sowa, Y., Orita, T., Yoshino, T., Okuyama, Y., Fujita, T., Ohtani-Fujita, N., Matsukawa, Y., Tokino, T., Yamagishi, H., Oka, T., Nomura, H., and Sakai, T. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 22199–22206.

## TARGETS OF ONCOGENES AND TUMOR-SUPPRESSORS: A KEY FOR UNDERSTANDING BASIC MECHANISMS OF CARCINOGENESIS

B.P. Kopnin

*Institute of Carcinogenesis,  
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences,  
Kashirskoye sh. 24, Moscow, 115478; fax: (095) 324-1205, E-mail: kopnin@imb.ac.ru*

Submitted September 17, 1999

Changes in expression of oncogenes and tumor suppressor genes play a crucial role in oncogenesis. Dysfunction of their protein products leads to abnormal regulation of signalling pathways which control cell cycle, apoptosis, genetic stability, cell differentiation and morphogenic reactions. Evidently alterations of namely these functions are responsible for both initial steps of neoplastic transformation and further tumor progression.

**KEY WORDS:** oncogene, tumor suppressor, apoptosis, genetic stability, differentiation.

УДК 576.385.5

## ФУНКЦИЯ ГЕНА p53: ВЫБОР МЕЖДУ ЖИЗНЬЮ И СМЕРТЬЮ

### Обзор

© 2000 г. П.М. Чумаков

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
117984 Москва, ул. Вавилова, 32; факс: (095) 135-1405,  
электронная почта: chumakov@imb.ac.ru

Поступила в редакцию 05.10.99

Ген p53 является центральным компонентом механизма, обеспечивающего удаление из организма патологических клеток. Многочисленные сигнальные пути отслеживают состояние клетки и в случае возникновения повреждений или сбоев, угрожающих приобретению наследственных изменений, вызывают активацию белка p53, который либо координирует процесс репарации, либо индуцирует самоубийство клетки. Ген p53 играет роль верховного судьи, который решает судьбу клеток и гарантирует их социальное поведение. Утрата гена p53 приводит к неконтролируемому накоплению генетических повреждений, приводящих к потере контроля со стороны организма, злокачественному росту клеток и смерти.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** опухолевый супрессор, онкоген, клеточный цикл, апоптоз, генетическая стабильность, транскрипция, конформация белка.

Одним из крупнейших достижений последних лет явилось выявление системы, которая обеспечивает экстренное удаление поврежденных и потенциально опасных для организма клеток. Функция этой системы заключается в отслеживании разнообразных повреждений и сбоев, а также стрессовых состояний, которые приводят или могут привести к наследуемым изменениям генетического аппарата, и выборе «мер пресечения» для вовлеченных в эти процессы клеток. В результате клетки либо временно задерживаются в сверхточных точках клеточного цикла (см. обзор Б.П. Копнина в настоящем номере журнала), где они имеют возможность исправить возникшие повреждения либо полностью выключаются из дальнейших делений, подвергаясь клеточной смерти по типу апоптоза или клеточному старению, ведущему в конечном итоге к смерти по типу некроза. Центральным компонентом этой системы является белок p53. Именно на p53 сходятся многообразные сигналы, сообщающие о возникших «нештатных» ситуациях, что сопровождается быстрым увеличением его экспрессии (преимущественно за счет стабилизации белковой молекулы) и переходе в функционально активное состояние. В результате происходит запуск ряда внутриклеточных процессов, ведущих к самоограничению или самоубийству клетки.

### ПОСЛЕДСТВИЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА p53

Функция p53 не является строго необходимой для нормального развития и функционирования организма: полное выключение гена p53 с помощью геномного нокаута приводит к рождению вполне нормальных мышей. Однако такие мыши редко доживают до шестимесячного возраста, поскольку они исключительно чувствительны к развитию злокачественных опухолей [1, 2]. Культивируемые клетки p53<sup>-/-</sup> мышей отличаются чрезвычайной геномной нестабильностью и демонстрируют значительные изменения кариотипа уже в первые дни пассирования *in vitro* [3].

Повреждения гена p53 играют центральную роль и в канцерогенезе человека. Точечные мутации и делеции гена p53 наблюдаются в ~50% случаев злокачественных заболеваний, хотя частоты повреждений варьируют в зависимости от типа опухоли [4, 5]. В опухолях человека и экспериментальных животных наблюдается также множество других способов инактивации p53, которые происходят без нарушения структуры его гена. В этих случаях происходят нарушения генов, вовлеченных в регуляцию активности p53. В таких клетках p53 либо неспособен активироваться в ответ на разнообразные стрессы, либо, напротив, его уровень повышен, но это не приводит к дальнейшему запуску характерных вну-

триклеточных процессов. В результате, как и в клетках с прямыми нарушениями гена p53, в той или иной степени происходит потеря контроля над поддержанием стабильности генома.

Таким образом, те или иные нарушения p53-зависимых процессов наблюдаются в подавляющем большинстве злокачественных заболеваний. Только после выключения p53-зависимого самоограничения поврежденных клеток создаются условия для быстрого накопления генетических изменений, ведущих к дальнейшей утрате элементов негативного контроля над клеточными делениями. Это приводит к фактическому выходу клетки из-под подчинения целостному организму и приобретению автономии. С этого момента клетка уже не может рассматриваться как часть организма, поскольку она вступает с ним в конкурентные взаимоотношения. В результате образуется опухоль, которая ведет себя как отдельный паразитический организм, способный эволюционировать согласно законам дарвиновского отбора. Последовательное накопление мутаций обеспечивает опухоли более быстрый и инвазивный рост, который прекращается лишь со смертью организма.

### БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ГЕНА p53

Ген p53 получил образное имя «страж генома» [6]. Действительно, этот ген координирует все основные процессы поддержания стабильности генома многоклеточного организма. Несмотря на чрезвычайную сложность генома, все клетки в организме генетически однородны. Это является результатом не только высокой точности репликации ДНК и эффективности репаративных систем, но и в значительной мере следствием постоянно идущего процесса p53-зависимой выбраковки клеток, осуществляемой либо в момент возникновения сбоя, либо даже под влиянием самого неблагоприятного воздействия, грозящего появлением генетических нарушений. Роль, которую берет на себя p53-зависимая система контроля, исключительно ответственна. На p53 сходятся многочисленные сигналы, отслеживающие состояние клетки и его окружение. Это достигается за счет разного рода модификаций белковой молекулы p53 посредством фосфорилирования, ацетилирования, связывания с другими молекулами, регулируемыми его активностью. В то же время реакции p53-зависимых механизмов должны быть адекватны ситуации. Многие процессы в клетке имеют тканеспецифический характер. Соответственно этому в разных клетках могут меняться требования к p53-зависимому контролю. Высокая пролиферативная активность клеток кишеч-

ного эпителия и органов кроветворения, например, требует настройки p53 на повышенную степень готовности. В таких клетках даже незначительные повреждения ДНК могут приводить к p53-зависимому апоптозу. Напротив, в редко делящихся клетках – гепатоцитах и ряде других – в физиологических условиях роль p53 менее заметна. Кроме того, один и тот же тип воздействия в зависимости от ситуации может иметь и физиологический, и патологический характер. Например, активация MAP-киназных каскадов под действием ростовых факторов имеет физиологический характер, в то время как те же процессы, инициированные перманентно активированным онкогеном, относятся к явной патологии. Поэтому физиологические процессы в определенных моменты требуют временного выключения контроля со стороны p53. Если же воздействие переходит некую допустимую для данной клетки черту, то p53-зависимые процессы должны вновь вступать в силу.

Столь строгие требования к избирательности действия p53 предполагают существование механизмов тончайшей регуляции его активности. И действительно, к настоящему времени накопилось огромное количество фактов, указывающих на сложность и изощренность p53-зависимых механизмов, объединяющих в единую систему многие казавшиеся ранее разрозненными регуляторные процессы. Если рассматривать p53-зависимую систему ограничения патологических клеток в виде сигнального пути, то на верхних этажах будут располагаться процессы распознавания повреждений, стрессов и сбоев. Далее эти воздействия должны сходить на p53, вызывая качественные и количественные изменения его экспрессии и активности. Нижние этажи этого пути будут включать эффекторные гены, на которые влияет то или иное состояние белка p53. В результате разворачивания процессов, опосредуемых генами-мишенями p53, клетка либо кратковременно задерживается в свечных точках, либо подвергается апоптозу или окончательному прекращению делений, вступая в состояние преждевременного клеточного старения. Нижние этажи p53-зависимого сигнального пути изучены наиболее полно. Они отражают механизм действия p53, который был предметом интенсивного изучения на протяжении последнего десятилетия. Сейчас уже выявлено несколько десятков генов, проводящих в исполнение супрессорные сигналы активированного p53. Данная статья посвящена главным образом многообразию путей функциональной активации p53, т.е. верхним этажам p53-зависимого сигнального пути. Однако прежде чем перейти к рассмотрению этих вопросов, необходи-



мо коротко суммировать основные сведения о p53 и механизме его действия. Более полную информацию читатели могут получить в ряде недавно опубликованных обзоров [7–13].

### ФУНКЦИИ БЕЛКА p53

p53 представляет собой полифункциональный белок, основная функция которого осуществляется в ядре. Ген p53 постоянно транскрибируется и транслируется, однако сам белок быстро подвергается убиквитинзависимой деградации в протеосомах [14, 15]. Поэтому в клетках большинства тканей уровни белка чрезвычайно низки и могут находиться на пороге детекции. Активация белка в ответ на разнообразные стрессы и повреждения происходит главным образом на посттрансляционном уровне за счет замедления его деградации, а также за счет конформационной перестройки молекулы, приводящей к повышению функциональной активности. p53 приписывают целый ряд функций и активностей. Он может выступать как транскрипционный репрессор [16], фактор, ингибирующий трансляцию некоторых мРНК [17]. Имеются сообщения о наличии у p53 3'-5'-экзонуклеазной активности [18], способности непосредственно связываться с участками одноцепочечной ДНК [19, 20], участками неспаренных оснований [21] и одностебчатых разрывов [22], что наводит на мысль о его непосредственном участии в узнавании поврежденных участков ДНК и в репарационных процессах [22]. Однако основной функцией p53, безусловно, является его способность служить транскрипционным фактором [23].

Молекула p53, имеющая размер 392 аминокислоты, образует тетрамерный комплекс, способный узнавать специфическую последовательность ДНК и стимулировать транскрипцию ряда генов, имеющих вблизи промотора соответствующий элемент ДНК. Элемент ДНК, с которым связывается p53, состоит из двух расположенных друг за другом на расстоянии от 0 до 13 нуклеотидов «полусайтов», имеющих обобщенную структуру типа: PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPu [24, 25]. Подобный элемент выявлен во многих генах, активируемых p53. В том числе он содержится в гене белка Mdm2, который является природным ингибитором p53 [26]. Белок Mdm2 блокирует транскрипционный домен p53 [27] и одновременно способствует экспорту p53 из ядра в системы протеосомной деградации [28].

На белковой молекуле p53 картировано несколько функционально-значимых доменов, играющих важную роль в проявлении и регуляции его активности [29].

Участок на N-конце (1–50 аминокислоты) содержит домен, вовлеченный в транскрипционную активацию генов-мишеней. Этот же участок ответствен и за взаимодействие с белком-ингибитором Mdm2 [30, 31]. N-Концевой домен играет важную роль в регуляции активности p53, поскольку там располагается несколько остатков серина и треонина, служащих мишенью для регуляторных киназ. Фосфорилирование N-концевых аминокислот приводит к изменению связывания p53 с белком Mdm2, а также к изменениям взаимодействий с факторами транскрипционного аппарата. В области между аминокислотами 43 и 73 расположен второй дополнительный транскрипционный домен, активность которого требуется для активации некоторых мишеней p53 [32].

Между аминокислотами 63 и 97 расположен гибкий пролин-богатый домен, в котором выявлены элементы типа RxxP. Этот домен важен для полного проявления супрессорной активности p53 [33]. Хотя механизм действия пролин-богатого домена пока не совсем ясен, предполагается, что он участвует в транскрипционно-зависимом [34] и транскрипционно-независимом апоптозе [35].

Центральный домен p53 между аминокислотами 100 и 300 принимает непосредственное участие в узнавании и связывании со специфическими последовательностями ДНК [36]. Структура этого домена играет исключительную роль в проявлении активности p53 в качестве транскрипционного фактора. Именно в этом домене картируется подавляющее большинство миссенс-мутаций гена p53, обнаруживаемых при различных злокачественных заболеваниях человека. При этом наблюдаются две характерные особенности. С одной стороны, почти каждая аминокислота этого домена с той или иной частотой может мутировать в опухолях и давать белок с нарушенной активностью. Тот факт, что любые изменения структуры данного участка приводят к нарушению функции белка, свидетельствует об исключительной хрупкости конформации p53, которая определяется именно центральной частью молекулы. С другой стороны, в центральном участке p53 выявлены горячие точки, по которым мутации происходят с повышенной частотой. Рентгеноструктурный анализ комплекса ДНК с ДНК-связывающим доменом p53 указывает на то, что именно аминокислоты горячих точек вовлечены в непосредственный контакт со специфической последовательностью ДНК [36]. Хрупкость конформации ДНК-связывающего домена p53 отражается и в изменении антигенных эпитопов. Многие мутантные белки утрачивают эпитоп для

моноклональных антител PAb1620 [37, 38], зато одновременно приобретают эпитоп, узнаваемый моноклональными антителами PAb240 [39]. Данная пара моноклональных антител является важным диагностическим инструментом, позволяющим регистрировать изменения конформации не только мутантного белка, но и неповрежденного p53, находящегося в различных физиологических состояниях [40].

Линкерный участок между аминокислотами 305 и 323 ответствен за ядерную локализацию белка p53 [41, 42].

Участок, ответственный за тетрамеризацию молекул p53 расположен между аминокислотами 323 и 356. Он имеет выраженную  $\alpha$ -спиральную структуру [43]. Утрата способности p53 к олигомеризации при нарушении  $\alpha$ -спирального домена приводит к функциональной инактивации [43, 44]. Молекулы p53 с инактивирующими мутациями в ДНК-связывающем домене также способны образовывать комплексы за счет  $\alpha$ -спирального домена. Гибридный комплекс между белком дикого типа и мутантом неактивен. Этим объясняется трансдоминантный (доминантно-негативный) характер миссенс-мутаций гена p53 [45].

Непосредственно на С-конце молекулы (аминокислоты 363–393) расположен щелочной домен, играющий важную роль в регуляции активности p53. Этот домен является мишенью для целого ряда модифицирующих ферментов. В немодифицированном состоянии щелочной домен препятствует образованию комплекса между ДНК и центральным ДНК-связывающим доменом p53. В этом случае молекула p53 находится в латентном состоянии. Удаление щелочного домена протеолизом приводит к стимуляции ДНК-связывающей активности p53 *in vitro* [46]. Такой же эффект наблюдается при обработке p53 моноклональными антителами PAb421, узнающими участок С-концевого домена [47], а также при добавлении синтетических пептидов, соответствующих этой же области p53 [48, 49]. В последнем случае активация p53 может происходить за счет разрушения пептидом комплекса С-концевого и центрального доменов p53. С-Концевой домен играет исключительно важную роль в регуляции активности p53 *in vivo*. Модификация этого участка киназами, ацетилазами, гликозилазами, а также за счет связывания с другими белками приводит к тонкому изменению ДНК-связывающей и трансактивационной способности p53. Кроме того, С-концевой участок p53 обладает способностью связываться неспецифически с участками одноцепочечной ДНК, неспаренными основаниями и концами ДНК [50], что указывает на его возможное участие в узнавании повреждений ДНК.

Основными последствиями активации p53 в клетках являются задержка прохождения по клеточному циклу и апоптоз. Однако биологические эффекты p53 не ограничиваются этими двумя процессами, поскольку сейчас уже ясно, что p53 может играть роль в процессах репарации ДНК, участвовать в некоторых важных внутриклеточных процессах, например в контроле репликации центросом [51], регулировать секрецию ангиогенных и прочих пептидных факторов, действуя на организменном уровне [52–54]. Несомненно, что список активностей p53 со временем будет продолжен.

## ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ МИШЕНИ БЕЛКА p53

p53 способен оказывать комплексное воздействие на транскрипцию генов, активируя экспрессию одних и репрессируя другие. Транскрипционная репрессия является функцией С-концевой части молекулы p53 [55] и отчасти обусловлена способностью связываться с базальным компонентом транскрипционного аппарата – фактором ТВР (TATA-Box Binding Protein) [56] и подавлением активности комплекса TFIID и TFIID [57]. Тем самым частично подавляется активность РНК-полимеразы II и РНК-полимеразы III. Кроме того, p53 репрессирует активность нескольких транскрипционных факторов, среди которых Spi1 [58], HIF-1 [59], рецептор тиреоидного гормона [60], эстрогенный рецептор [61] и транскрипционный фактор STAT5 [62]. В результате p53 способен репрессировать транскрипцию большого числа генов, среди которых ген *BCL2* [63] и *RELA* [64], играющие ингибирующую роль в апоптозе; ген *MDR1* [65], *Hsp70* [66], ген актина [67], ген белка, связанного с микротрубочками – MAP4 [68] и ген *p19-ARF* [69], продукт которого препятствует деградации p53.

Большая часть сведений о механизмах p53-индуцируемых процессов была получена путем идентификации эффекторных генов, экспрессия которых повышается под действием p53. Помимо гена *MDM2*, осуществляющего негативную регуляцию гена p53, к настоящему времени идентифицировано большое число p53-регулируемых генов. Их можно условно разделить на несколько групп.

Гены, активация которых способствует подавлению клеточного цикла. Основным эффекторным геном p53 является белок p21-WAF1, являющийся мощным ингибитором циклинзависимых киназ (cdk) [70]. p21 отвечает за остановку в фазе G1 в ответ на гиперэкспрессию p53 [71] и повреждения ДНК [72, 73]. p21-WAF1 в ос-

новном связывается с циклин-*cdk*-комплексами G1- и S-фаз, но плохо связывается с циклин B-*cdc2*. Кроме того, p21 связывается с «ядерным антигеном пролиферирующих клеток» (PCNA) и таким образом может уменьшать процессивность ДНК-полимеразы, что, возможно, имеет следствием переключение репликативного синтеза на преимущественно репаративный [74].

Известны уже три p53-респонсивных гена, участвующих в остановке в фазе G2 клеточного цикла. Продукт гена *GADD45*, как и p21, способен связываться с PCNA [75]. Кроме того, он связывается и ингибирует комплекс циклин B-*cdc2*, что приводит к задержке в G2 [76]. Белок 14-3-3- $\sigma$  также кодируется p53-респонсивным геном [77]. Этот белок связывает фосфорилированную форму *cdc25c* и выводит ее из оборота, что предотвращает активацию комплекса циклин B-*cdc2*. Продукт p53-респонсивного гена B99 локализуется преимущественно на микротрубочках в фазе G2 [78], а его экспрессия в p53-негативных клетках сопровождается задержкой в этой фазе. Таким образом, влияние p53 на фазу G2 опосредуется активностями нескольких генов с использованием различных механизмов.

**Гены, участвующие в p53-зависимом апоптозе.** В отличие от небольшого числа p53-регулируемых генов, участвующих в контроле клеточного цикла, число потенциальных медиаторов p53-зависимого апоптоза велико и продолжает расти. Возможно, такое многообразие объясняется тем, что в клетках разных тканей, а также в клетках, находящихся в различающихся физиологических условиях, могут реализоваться альтернативные программы p53-зависимого апоптоза.

Ген *BAX* содержит p53-респонсивный элемент и активируется под действием p53 [79]. Продукт гена *BAX* кодирует проапоптотический белок семейства Bcl2 [80], который способствует выбросу из митохондрий цитохрома c [81]. В кооперации с ARAF1 цитохром c принимает участие в активации каспазы 9, запускающей апоптотический каскад [82]. Установлено, что по крайней мере в фибробластах для апоптоза, индуцированного повреждениями ДНК, требуется экспрессия белка *BAX* [83].

Ген *Fas*-рецептора (APO1) также активируется p53 [84]. Это делает клетки более чувствительными к *Fas*-лиганду, который вызывает тримеризацию *Fas*/APO1, после чего его цитоплазматический «домен смерти» ассоциирует с адапторной молекулой FADD. В результате происходит вовлечение в комплекс прокаспазы 8, которая, активируясь, инициирует апоптотический каскад. Интересно, что p53 может инициировать апоптоз с участием *Fas*/APO1-рецептора и по независимому от транскрипции механизму, вы-

зывая быструю транслокацию APO1 из аппарата Гольджи на поверхность клетки [85].

p53 активирует и ген другого представителя семейства рецепторных белков, содержащих «домен смерти», который кодирует белок KILLER/DR5 [86]. KILLER/DR5 является одним из рецепторов, активируемых TRAIL-лигандом [87]. Так же как и представители других рецепторных индукторов апоптоза, KILLER/DR5 инициирует запуск каспазного каскада.

Белок-ингибитор инсулиноподобного фактора роста IGF-BP3 также кодируется p53-зависимым геном. Цитокин IGF является мощным антиапоптотическим фактором [88]. IGF индуцирует Mdm2, вызывая понижение активности p53 [89]. IGF-BP3 снимает его эффекты и тем самым индуцирует апоптоз. Интересно, что одновременно p53 подавляет экспрессию самого IGF [90], тем самым усиливая проапоптотический эффект. Таким образом данные четыре гена участвуют в сложной регуляторной петле.

PAG608 относится к группе белков, содержащих цинковый палец. Он преимущественно локализуется в ядрышках и вызывает при гиперэкспрессии морфологические изменения, характерные для апоптоза. Этот белок индуцируется по p53-зависимому механизму [91] и, вероятно, также является проводником проапоптотической активности p53.

Довольно большая группа p53-индуцируемых генов была обнаружена при широком скрининге генов, дифференциально экспрессирующихся в ответ на включение p53. Гены группы *PIG* [92] вызывают образование в клетке радикалов активного кислорода, которые приводят к повреждению мембран митохондрий и запуску апоптоза. В одном из генов (*PIG3*) был обнаружен p53-респонсивный элемент, который в отличие от большинства известных p53 элементов требует для своей активации интактного пролин-богатого домена белка p53 [34].

Белок p85, кодируемый p53-регулируемым геном, является регуляторной субъединицей P13 киназы [93]. p85 требуется для p53-зависимого апоптоза, вызванного перекисью водорода, хотя детали его участия остаются неясными.

Ген циклина G, функция которого до настоящего времени неясна, содержит p53-респонсивный элемент. Гиперэкспрессия этого гена приводит к подавлению пролиферации [94] и усилению апоптоза, вызванного разными воздействиями [95].

**Гены, кодирующие ингибиторы ангиогенеза и другие секретируемые факторы.** Клетки, экспрессирующие активированный p53, секретируют белковые факторы, подавляющие ангиогенез. Напротив, при утрате гена p53 секреция прекращается [53]. p53 активирует экспрессию гена антиангиогенного фактора тромбоспондина 1

(Tsp1) [53], а также других ингибиторов ангиогенеза – BAI1 [96] и GD-AiF [97]. Кроме того, среди генов, активируемых p53, обнаружены представители и других секреторных ингибиторов роста –  $\beta$ -ингибин, TGF- $\beta$ 2, ингибиторы сериновых протеаз и др. Очевидно, что следствием действия таких факторов должно быть подавление пролиферации соседних клеток [54]. Таким образом, действие p53 как опухолевого супрессора может распространяться и на окружающие клетки.

**Гены, функция которых пока невыяснена.** Эта группа включает постоянно растущее число генов, индуцируемых экспрессией p53. Как правило, это малоизученные или неизвестные ранее гены, обнаруженные при скрининге дифференциально экспрессирующихся генов.

Многообразие перечисленных мишеней гена p53 хорошо иллюстрирует стратегию этого гена, заключающуюся в избыточности путей его воздействия на клетку. В случае опасности параллельно включаются сразу несколько механизмов ограничения, что позволяет гарантировать исключение последствий возникшего сбоя. Кроме того, избыточность механизмов воздействия объясняется разнообразием реакций разных типов клеток организма: то что действует на одни типы клеток, не действует на другие. Избирательное блокирование одних путей и усиление других позволяют разным типам клеток адекватно реагировать на меняющиеся условия. Остается загадкой лишь одно обстоятельство: почему при столь высоком многообразии реакций на изменение экспрессии одного гена в клетке не создано также гена с параллельной для p53 функцией? Ведь достаточно лишь единичной мутации в кодирующей области p53, как вся эта утонченная регуляция полностью выключается и клетка утрачивает контроль за целостностью своего генома. Как и все в природе, это вряд ли можно считать случайностью. Возможно, уязвимость именно самого важного регулятора жизни и смерти организма, каковым, бесспорно, является p53, имеет более широкий общебиологический смысл. К примеру, таким образом может закладываться определенная частота ухода из жизни отдельных особей до достижения ими малопродуктивного преклонного возраста. Однако на этот счет можно выдвигать и другие гипотезы, рассмотрение которых не является предметом настоящей статьи.

#### ЛАТЕНТНОЕ И АКТИВИРОВАННОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКА p53

Как уже говорилось, в условиях нормального функционирования в клетке содержание и ак-

тивность p53 невелики. Хотя в некоторых типах клеток содержание p53 и может быть заметным, он находится в неактивной латентной форме. Латентная форма p53 лишена способности активировать транскрипцию p53-респонсивных генов. Это не означает, однако, что, находясь в латентной форме, p53 полностью лишен какой-либо активности. Возможно, в такой форме он играет какую-то роль, например в процессах репарации ДНК. В частности, было обнаружено, что латентная форма p53, лишенная способности связываться с ДНК, может узнавать участки одноцепочечной ДНК, неспаренные основания, а также имеет повышенную 3'-5'-экзонуклеазную активность. Напротив, активированная форма p53 утрачивает экзонуклеазную активность, но приобретает способность связываться с ДНК [98, 99]. Наличие в некоторых типах клеток определенных уровней p53 вне стрессовых ситуаций может указывать либо на то, что в данной системе p53 осуществляет какую-то «повседневную» функцию, либо на то, что латентная форма p53 накапливается на случай внезапной потребности для того, чтобы быстро перейти в активное состояние и тем самым обеспечить своевременное ограничение поврежденной клетки.

Активация гена p53 происходит под действием неблагоприятных ситуаций. При этом изменении транскрипции гена p53 происходит редко. Тем не менее, в регуляторной области промотора гена p53 имеются участки связывания некоторых транскрипционных факторов, которые могут приводить к определенным изменениям транскрипции [100]. Эти изменения, однако, носят скорее всего не экстренный характер, а происходят в порядке общей настройки на готовность клетки к быстрой активации p53 на посттрансляционном уровне. К некоторому повышению транскрипции гена p53 приводит гиперэкспрессия c-myc [101] и NF- $\kappa$ B [102]. Существенная активация гена p53 на транскрипционном уровне известна только для ранних эмбрионов [103], а также для недифференцированных эмбриональных тератокарцином, где уровень мРНК p53 повышен на порядок по сравнению с клетками взрослого организма [104].

Накопление p53 в ответ на стрессы происходит даже в присутствии ингибиторов синтеза РНК и белка, что говорит о его посттрансляционном характере [104, 105]. При этом происходит значительная стабилизация p53 [106]. Однако свой вклад в суммарный эффект индукции p53 могут вносить и изменения на других уровнях, например за счет увеличения интенсивности трансляции мРНК [107].

Кроме количественного накопления p53 происходят также глубокие качественные изме-



нения белковой молекулы, сопровождающиеся ее переходом из латентного в функционально-активное состояние. Эти изменения происходят за счет фосфорилирования, дефосфорилирования, ацетилирования и гликозилирования различных участков белковой молекулы, а также за счет образования ковалентных и нековалентных комплексов с другими белками. Многообразие участков модификации и факторов, взаимодействующих с p53, обеспечивает тонкую регуляцию его активности. Активация p53 не является необратимой, поскольку имеются механизмы обратной связи, позволяющие вернуть p53 в менее активное или латентное состояние после преодоления дефектов и сбоев.

Для функционирования p53 как фактора транскрипции требуется его взаимодействие со специфическим элементом ДНК. Модификация С-концевой части молекулы, индуцируемая разнообразными стрессовыми механизмами, сопровождается конформационной перестройкой и приобретением белком способности связываться с ДНК. Но для начала транскрипции требуется сложное взаимодействие N-концевой транскрипционно-активаторной части p53 с компонентами транскрипционного аппарата – белками комплекса TFIID – TBP (TATA-Box Binding Protein) и TBP-ассоциированными факторами TAFII [56, 108–111]. Небольшой гидрофобный участок p53 вокруг Leu-22 и Trp-23 отвечает за взаимодействие сразу с несколькими белками транскрипционного аппарата [30]. Кроме того, для активации специфических промоторов в комплексе с TFIID должны присутствовать транскрипционные коактиваторы – CREB-binding protein (CBP) и близкородственный ему белок p300. p300/CBP обладает гистон-ацетилазной активностью. Ацетилирование гистонов играет важную роль в модуляции структуры хроматина при активации транскрипции [112–114], увеличивая доступность хроматина для транскрипционного аппарата. p300/CBP способен напрямую взаимодействовать с комплексом РНК-полимеразы II и таким образом служить проводником, обеспечивающим инициацию транскрипции в ответ на связывание транскрипционного фактора. N-Концевой трансактивационный домен p53 также взаимодействует с p300/CBP CBP [115], причем одновременно и с N-, и с С-концевыми участками p300/CBP [116]. P300/CBP обладает также способностью ацетилировать некоторые транскрипционные факторы и повышать их активность [117]. При взаимодействии с p53 он ацетилирует Lys-382 находящийся в С-концевом регуляторном домене [118, 119]. Находящийся в комплексе с p300/CBP другой транскрипционный коактиватор-PCAF-ацети-

лирует p53 в области сигнала ядерной локализации по Lys-320 [119, 120]. Ацетилирование по каждому из этих двух участков приводит к значительному повышению трансактивационной функции p53 [119]. В результате указанных процессов происходит инициация транскрипции с p53-респонсивного промотора.

Поддержание низкого уровня активности p53 вне стрессов обеспечивается за счет системы активной убиквитинзависимой деградации. Ключевую роль в этом процессе играет белок Mdm2. p53 активирует промотор гена *MDM2*, продукт которого подавляет активность самого p53 [26, 27]. Mdm2 связывается с N-концевым участком p53 в районе домена, активирующего транскрипцию. Связывание приводит к репрессии транскрипционной активности p53 [121] и одновременно – к стимуляции протеасомной деградации. При разрушении взаимодействия Mdm2 и p53 введением мутаций происходят активация и накопление p53 [122, 123]. К активации p53-зависимой транскрипции и следующей за ней остановке клеточных делений приводит также разрушение Mdm2–p53-комплекса моноклональными антителами [124] или конкурирующими пептидами [125], что указывает на необходимость постоянного сдерживания p53 для поддержания пролиферации соматических клеток.

Репрессия транскрипционной функции p53 белком Mdm2 происходит за счет сложного взаимодействия с компонентами транскрипционного аппарата. Mdm2 связывается одновременно с N-концевым участком p53, TBP, TAFII250 [126, 127] и p300/CBP [116]. С транскрипционно-активаторным доменом p53 взаимодействуют одновременно и N-, и С-концевые участки p300/CBP. Mdm2 связывается одновременно с N-концевыми участками p300/CBP и p53 и препятствует образованию комплекса между этими белками, что ведет к репрессии p53-зависимой транскрипции [116]. Интересно, что похожий механизм репрессии p53-зависимой транскрипции используют вирусные белки, подавляющие функцию p53. Продукт аденовирусного онкогена E1a способен связываться с p300/CBP, вытеснять его из комплекса с PCAF и подавлять способность обоих белков ацетилировать p53 [128]. Продукт онкогена E6 вируса папилломы человека одновременно с его способностью ускорять деградацию p53 осуществляет также репрессию p53-зависимой транскрипционной активации за счет взаимодействия с p300/CBP [129].

Ускорение деградации p53 при связывании с Mdm2 происходит за счет двух процессов. Как p53 [130], так и Mdm2 содержат участки, отвечающие за экспорт из ядра [131, 132]. Благодаря этим сигналам Mdm2 выводит p53 из ядра [133,



134] и направляет его в протеасомы, где оба белка подвергаются убиквитинзависимой деградации [135]. Кроме того, сама молекула Mdm2 обладает убиквитинлигазной активностью и принимает участие в убиквитинизации p53 [136]. В деградации p53 играет также некую роль комплекс Mdm2 с p300/CBP [137].

Кроме Mdm2-зависимой деградации в клетках, не подвергнутых стрессам, функционирует альтернативная система, которая использует неактивированную JNK (Jun N-terminal kinase). JNK связывается с p53 в районе аминокислотных остатков 97–117 и способствует убиквитинированию и дестабилизации p53 по пока неизвестному механизму [138, 139].

### АКТИВАЦИЯ p53 В ОТВЕТ НА СТРЕССЫ

Нарушения описанных выше механизмов сдерживания активности p53 происходят в ответ на многочисленные стрессовые ситуации. Стабилизация p53 достигается за счет ковалентной модификации N-концевой части p53 или связывания с регуляторами взаимодействия p53 и Mdm2 [11]. В ответ на повреждения ДНК происходит фосфорилирование участка связывания Mdm2. Другой механизм использует связывание с p53 и Mdm2 белком ARF (p19-ARF мыши и p14-ARF человека) – продуктом альтернативной рамки локуса *p16-INK4a*. Оба механизма приводят к одному результату, хотя и проводятся за счет независимых сигнальных путей, активируемых разными стимулами. Стрессорные воздействия также приводят к модификациям в С-концевой части молекулы p53, сопровождающимся общим усилением функциональной активности.

N-Концевой домен p53 содержит семь потенциальных участков фосфорилирования, некоторые из них действительно подвергаются фосфорилированию *in vivo*. Идентифицировано также несколько киназ, способных модифицировать эти участки *in vitro*. Однако для некоторых из них имеются только не прямые данные, указывающие на их возможное участие. Повреждения ДНК сопровождаются быстрым фосфорилированием Ser-15 [140, 141], который является субстратом для фосфорилирования «активируемой ДНК протеинкиназой» – DNA-PK [142]. DNA-PK способна связываться с участками разрывов ДНК, в результате чего повышается ее киназная активность [143, 144]. Замена Ser-15 на Ala приводит к потере p53 супрессорных свойств [145], что указывает на возможное активирующее значение фосфорилирования этой аминокислоты. В мышцах, полностью дефектных по DNA-PK, p53 не способен связываться с ДНК и активиро-

ваться в ответ на ионизирующее облучение [146, 147]. Таким образом, DNA-PK необходима для активации p53 под действием повреждений ДНК. DNA-PK, выделенная из необлученных клеток, не обладает способностью активировать p53 *in vitro*. Для этого требуется некий дополнительный фактор, присутствующий в экстрактах облученных клеток [146]. Таким образом, одной DNA-PK недостаточно для активации p53 в облученных клетках. Одновременно с фосфорилированием Ser-15 p53 DNA-PK фосфорилирует также p53-связывающий участок белка Mdm2, в результате чего образующийся в ответ на повышение уровня p53 Mdm2 оказывается неспособным подавлять активность p53. Лишь в результате репарации и снижения уровня DNA-PK образуется нефосфорилированная форма Mdm2, способная инактивировать p53 [148].

Ser-15 p53 может фосфорилироваться и под действием другой киназы – белка ATM [149, 150]. ATM относится к тому же классу белков, что и DNA-PK. Ген *ATM* дефектен при редком аутосомно-рецессивном заболевании атаксии-телеангиэктазии (АТ), которое сопровождается гиперчувствительностью к ионизирующему излучению, иммунной недостаточностью, повышенным риском злокачественных заболеваний, мозжечковой атаксией вследствие дегенерации нейронов и др. [151]. Культивируемые клетки больных АТ имеют нарушения активации p53 в ответ на ионизирующее облучение [152–154] и нарушения сверочных точек клеточного цикла [155–157]. Фосфорилирование Ser-15 p53 в АТ-клетках в ответ на ионизирующее излучение значительно замедленно [140]. Введение в АТ-клетки рекомбинантного *ATM* восстанавливает способность этих клеток фосфорилировать Ser-15 после ионизирующего облучения [158]. Таким образом, белок ATM также участвует в проведении сигнала от повреждения ДНК до индукции p53.

Другой представитель обширного семейства *ATM*-подобных генов, *ATR/FRP-1*, который, как и *ATM*, принимает участие в сверочных точках клеточного цикла [159, 160], также обладает способностью фосфорилировать Ser-15 p53 [161], однако его активность на порядок ниже, чем активность *ATM* [150].

Очевидно, что белок ATM не является единственной киназой, фосфорилирующей Ser-15 в ответ на повреждения ДНК. Возможно, тип киназы, фосфорилирующей этот сайт, зависит от характера ДНК-повреждающего воздействия. Например, в клетках, дефектных по гену *ATM*, при нарушении активации p53 в ответ на ионизирующее излучение сохраняется нормальная активация на ультрафиолет [154]; при этом происходит фосфорилирование p53 по Ser-15 [140].

Возможно, в данном случае Ser-15 фосфорилируется посредством DNA-PK либо других представителей семейства PI3K – подобных белков (ATR и др.).

Поскольку при повреждениях ДНК Ser-15 служит мишенью нескольких киназ в ответ на повреждения ДНК, видимо, фосфорилирование именно этой аминокислоты важно для увеличения активности p53. И действительно, такая модификация значительно ослабляет способность Mdm2 образовывать комплекс с p53 и подавлять вызываемую p53 транскрипционную активацию респонсивных генов [141]. Другие сайты фосфорилирования в N-концевой области p53 также могут участвовать в регуляции связывания белка Mdm2 в ответ на повреждения ДНК [119, 162], однако их роль предстоит еще выяснить.

ДНК-повреждающие воздействия индуцируют модификации и в других участках молекулы p53. При воздействии ультрафиолетового облучения происходит фосфорилирование Ser-389 мышинного p53 (соответствует Ser-392 p53 человека) [163, 164]. Это происходит, по-видимому, за счет казеинкиназы II (CKII), которая фосфорилирует данный участок *in vitro* [165]. Данный сайт не фосфорилируется под влиянием других ДНК-повреждающих воздействий и конкретные пути регуляции СКП пока неясны. В С-концевой области p53 имеется еще несколько киназных сайтов, фосфорилирование которых приводит к активации ДНК-связывающей функции p53, однако остается неясным, какую роль играют эти сайты в ответе на стрессы. Например, фосфорилирование Ser-315 циклинзависимыми киназами может приводить не только к активации p53, но и к изменению специфичности взаимодействия с различными подтипами p53-связывающих последовательностей. Таким путем, возможно, достигается модуляция p53-зависимых эффектов на разных стадиях клеточного цикла [166].

Интересно, что удаление всех потенциальных сайтов фосфорилирования не приводит к потере способности p53 стабилизироваться и активироваться под действием поврежденных ДНК [167, 168]. Значит, фосфорилирование не является единственным способом активации p53. И действительно, под действием ионизирующего излучения через активацию ATM происходят дефосфорилирование Ser-376 и ковалентное связывание с этим участком белка семейства 14-3-3, что существенно повышает транскрипционную активность p53 [169]. Ser-376 фосфорилируется протеинкиназой С. Ранее было показано, что фосфорилирование этого сайта приводит, с одной стороны, к приобретению латентной формы p53 способности связываться с ДНК, а с

другой – к подавлению транскрипционной активности [170–172]. Поэтому, возможно, РКС действует на p53 для временного отключения его активности. ATM-индуцированное дефосфорилирование и связывание белка 14-3-3 восстанавливают активность p53.

Важную роль в активации p53 под действием поврежденных ДНК играет ацетилирование С-концевого домена [120]. Фосфорилирование по Ser-15 и вызванная им диссоциация белка Mdm2 приводят к значительной активации ацетилирования Lys-382, осуществляемого p300/CBP [173]. Усиливается также ацетилирование Lys-320 с помощью PCAF [120]. Один из связанных с PCAF белков – PAF400 (400 кДа, PCAF-Associated Factor) – имеет значительную гомологию с суперсемейством ATM-подобных белков (FRAP, ATM, ATR, каталитической субъединицей DNA-PK). Хотя в отличие от перечисленных белков PAF400 не обладает киназной активностью, этот белок может играть определенную роль в стимуляции ацетилирования p53 в ответ на повреждения ДНК [174]. Таким образом, высказывается механизм, приводящий в ответ на повреждения ДНК к транскрипционной активации p53 и регулируемых им генов посредством сигнального пути, связывающего активности N-концевых киназ (DNA-PK, ATM) и ацетилаз, осуществляющих модификацию транскрипционного аппарата.

В механизме активации p53 под действием поврежденных ДНК остается много неясных моментов. В частности, неясно участие poly(ADP-ribose)-полимеразы (PARP), которая играет существенную роль в распознавании поврежденных ДНК и репарации. На некоторых клеточных моделях утрата PARP сопровождается угнетением индукции p53 [175–177], в то время как на других моделях такие различия менее выражены. В фибробластах PARP-/- мышей наблюдалась нормальная функциональная активация p53 при отсутствии заметной стабилизации белка [178].

Недавно был выявлен еще один механизм ATM- и p53-зависимого ограничения пролиферации клеток в ответ на повреждения ДНК, который включает продукт онкогена c-Abl. Было установлено, что активация тирозинкиназной активности c-Abl в облученных клетках требует функции гена ATM [179], который непосредственно фосфорилирует белок c-abl [180]. Активированный c-Abl связывается с p53, усиливает его транскрипционную активность [181] и нейтрализует ингибирующее действие Mdm2 [182]. В дополнении к этому связывание c-Abl с p53 приводит к значительной репрессии синтеза cdk2, что само по себе достаточно для остановки делений фибробластов p21-/- мышей [183]. Механизм такой репрессии cdk2 остается неясным.

Альтернативный механизм стабилизации и активации функций p53 осуществляется за счет вытеснения p53 из комплекса с Mdm2 посредством белка ARF. Известно, что локус *INK4a-ARF* кодирует два альтернативных транскрипта, определяющих синтез p16-INK4a – ингибитора комплекса циклин D-CDK и белка, также обладающего антипролиферативной активностью, – p19-ARF (p14-ARF в клетках человека) [184]. ARF обладает способностью при гиперэкспрессии повышать уровень p53 и вызывать характерные p53-зависимые эффекты [185]. Мыши, в которых избирательно инактивирован ген *ARF*, характеризуются повышенной чувствительностью к опухолевым заболеваниям [186], а получаемые от них эмбриональные фибробласты оказываются иммортальными. При этом в клетках *ARF*<sup>-/-</sup> сохраняется ненарушенной способность к задержке клеточного цикла в ответ на повреждения ДНК. Не нарушена также вызываемая повреждениями ДНК активация p53 и его геном-мишеней [184, 187]. Таким образом, ARF действует выше от p53, но с использованием отдельного сигнального пути. Он способен связываться *in vivo* с Mdm2 и образовывать тройной комплекс, содержащий ARF, Mdm2 и p53 [69, 185, 188, 189]. Образование таких комплексов возможно из-за того, что С-концевой сегмент Mdm2 связывается с N-концевым сегментом ARF [185, 188], а N-концевой сегмент Mdm2 образует комплекс с p53 [126]. В результате взаимодействия ARF предотвращает экспорт комплекса Mdm2 – p53 из ядра в цитоплазму [190, 191], а также подавляет убиквитин-лигазную активность Mdm2 в отношении p53 [189, 192]. Вопрос о возможном усилении под влиянием ARF деградации белка Mdm2 остается спорным [13, 188] и противоречит наблюдениям, указывающим на повышение уровня p53 вслед за вызываемым ARF увеличением транскрипционной активности p53 [185, 193, 194]. ARF может связывать p53 и в отсутствие Mdm2 [185], что указывает на его способность разобщать комплекс p53–Mdm2, действуя на оба компонента. Таким образом, в основе способности ARF повышать уровень p53 лежат механическое вытеснение Mdm2 и снятие вызываемых им ограничений функции p53. В свою очередь p53 подавляет экспрессию ARF [69, 185], образуя тем самым еще одну регуляторную петлю.

ARF принимает участие в функциональной активации p53 в ответ на действие вирусных и активированных клеточных онкогенов. Гиперпролиферативные сигналы ведут к индукции ARF, сопровождающейся p53-зависимой задержкой делений или индукцией p53-зависимого апоптоза. Например, при экспрессии онкогена *RAS* в первичных фибробластах наблюдаются активация

p53 и задержка прохождения по клеточному циклу [195]. Клетки же, дефектные по гену *ARF*, после введения *RAS* трансформируются и растут без ограничений [184], причем в них не происходит накопления p53 [196]. Введение в такие клетки экзогенного гена *ARF* приводит к остановке пролиферации [197].

Лишенные *ARF* клетки иммортальны [184]. Отсутствие *ARF* в этой системе как бы имитирует действие «иммортализирующих онкогенов» *тус* и *E1A*. Между тем долгое время оставалось непонятным, почему эти иммортализирующие онкогены при их введении в клетки оказываются мощными индукторами апоптоза. С открытием ARF стало ясно, что как онкоген *E1A* [193], так и онкоген *тус* [194] индуцируют экспрессию ARF и ведут к активации p53 и усилению апоптоза. Под давлением отбора довольно быстро выживают клетки, утратившие функцию либо p53, либо ARF, что ведет к иммортализации.

В настоящее время некоторые детали сигнального пути от онкогена *тус* на ARF остаются неясными [194]. *RAS* может активировать ARF по пути Ras-Raf-MAPK-E2F [196]. Сигнальный путь, ведущий к активации ARF под действием *E1A*, выглядит следующим образом. Промотор гена *ARF* активируется под действием транскрипционного фактора E2F [198]. E2F в свою очередь контролируется белком Rb. Поэтому *E1A*, а также другие онкогены, осуществляющие инактивацию Rb, приводят к повышению уровня E2F и индукции ARF.

Очевидно, что ARF-зависимые механизмы индукции p53 могут играть значительную роль в ограничении клеток, претерпевших сбой в экспрессии генов, регулирующих пролиферацию. Вполне возможно, что *ARF* может выступать в роли опухолевого гена-супрессора. Известно, что многие виды рака человека часто содержат точечные мутации и делеции в локусе *INK4a-ARF* [199]. Однако в связи с тем, что данный локус кодирует по крайней мере два разных гена, еще предстоит разобраться, какая часть обнаруживаемых повреждений имеет отношение к гену *ARF*. Тем не менее в сигнальном пути ARF-p53 уже идентифицирован новый онкоген, экспрессия которого может иметь отношение к канцерогенезу человека. Это ген *TWIST*, продукт которого репрессирует промотор гена *ARF* и подавляет p53-зависимые эффекты [200]. Экспрессия гена *TWIST* повышена в половине случаев рабдомиосарком, что указывает на его возможное участие в данной патологии.

Несмотря на существенный прогресс в понимании механизмов индукции p53 под действием повреждений ДНК и гиперэкспрессии онкогенов пока очень мало известно о пути активации

p53 в ответ на другие стрессы. К индукции p53 могут приводить такие воздействия, как гипоксия [201, 202], гипертермия [203], нарушения тубулинового [204] и актинового цитоскелета, неправильное расхождение хромосом, приводящее к образованию микроядер [205], открепление клеток от субстрата [206], остановка синтеза ДНК и РНК, истощение запасов нуклеотидов [10] и прочее. Сейчас уже ясно, что некоторые из этих воздействий могут использовать принципиально отличающиеся механизмы индукции p53. Например, в условиях гипоксии стабилиза-

ция и активация p53 могут осуществляться за счет физического связывания p53 с  $\alpha$ -субъединицей HIF-1 – транскрипционного фактора, индуцирующего ряд адаптивных генов, специфичных для гипоксического состояния [207].

Дальнейшая расшифровка сигнальных путей, ведущих к активации p53, является предметом интенсивных исследований. Результаты этих исследований, безусловно, приведут к раскрытию новых, не менее красивых механизмов, позволяющих клеткам организма балансировать между состоянием жизни и смерти.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992) *Nature*, 356, 215–221.
- Lavigne, A., Maltby, V., Mock, D., Rossant, J., Pawson, T., and Bernstein, A. (1989) *Mol. Cell Biol.*, 9, 3982–3991.
- Tsukada, T., Tomooka, Y., Takai, S., Ueda, Y., Nishikawa, S., Yagi, T., Tokunaga, T., Takeda, N., Suda, Y., Abe, S., Matsuoma, I., Ikawa, Y., and Aizawa, A. (1993) *Oncogene*, 8, 3313–3322.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. (1991) *Science*, 253, 49–53.
- Levine, A.J., Momand, J., and Finlay, C.A. (1991) *Nature*, 351, 453–456.
- Lane, D.P. (1992) *Nature*, 358, 15–16.
- El-Deiry, W.S. (1998) *Semin. Cancer Biol.*, 8, 345–357.
- Gottlieb, T.M., and Oren, M. (1998) *Semin. Cancer Biol.*, 8, 359–368.
- Selivanova, G., Kawasaki, T., Ryabchenko, L., and Wiman, K.G. (1998) *Semin. Cancer Biol.*, 8, 369–378.
- Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B., and Stark, G.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 1–4.
- Prives, C. (1998) *Cell*, 95, 5–8.
- Prives, C., and Hall, P.A. (1999) *J. Pathol.*, 187, 112–126.
- Sherr, C.J. (1998) *Genes Dev.*, 12, 2984–2991.
- Chowdary, D.R., Dermody, J.J., Jha, K.K., and Ozer, H.L. (1994) *Mol. Cell Biol.*, 14, 1997–2003.
- Ichihara, A., and Tanaka, K. (1995) *Mol. Biol. Rep.*, 21, 49–52.
- Ginsberg, D., Mechta, F., Yaniv, M., and Oren, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9979–9983.
- Ewen, M.E., and Miller, S.J. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1242, 181–184.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W., and Grosse, F. (1996) *Cell*, 85, 1089–1099.
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K.G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 413–417.
- Jayaraman, J., and Prives, C. (1995) *Cell*, 81, 1021–1029.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A., and Griffith, J. (1995) *Cell*, 81, 1013–1020.
- Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M.E., and Tegtmeyer, P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9455–9459.
- Raycroft, L., Wu, H.Y., and Lozano, G. (1990) *Science*, 249, 1049–1051.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991) *Science*, 252, 1708–1711.
- Funk, W.D., Pak, D.T., Karas, R.H., Wright, W.E., and Shay, J.W. (1992) *Mol. Cell Biol.*, 12, 2866–2871.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993) *Genes Dev.*, 7, 1126–1132.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., and Levine, A.J. (1992) *Cell*, 69, 1237–1245.
- Lozano, G., and Montes de Oca Luna, R. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1377, 55–59.
- Ko, L.J., and Prives, C. (1996) *Genes Dev.*, 10, 1054–1072.
- Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B., and Levine, A.J. (1994) *Genes Dev.*, 8, 1235–1246.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., and Pavletich, N.P. (1996) *Science*, 274, 948–953.
- Venot, C., Maratrat, M., Sierra, V., Conseiller, E., and Debussche, L. (1999) *Oncogene*, 18, 2405–2410.
- Walker, K.K., and Levine, A.J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 15335–15340.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L., and Debussche, L. (1998) *EMBO J.*, 17, 4668–4679.
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., and Prendergast, G.C. (1997) *Oncogene*, 15, 887–898.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994) *Science*, 265, 346–355.
- Milner, J., Cook, A., and Sheldon, M. (1987) *Oncogene*, 1, 453–455.
- Cook, A., and Milner, J. (1990) *Br. J. Cancer*, 61, 548–552.
- Gannon, J.V., Greaves, R., Iggo, R., and Lane, D.P. (1990) *EMBO J.*, 9, 1595–1602.
- Milner, J. (1994) *Semin. Cancer Biol.*, 5, 211–219.
- Shaulsky, G., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990) *Oncogene*, 5, 1707–1711.
- Addison, C., Jenkins, J.R., and Sturzbecher, H.W. (1990) *Oncogene*, 5, 423–426.
- Sturzbecher, H.W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E., and Jenkins, J.R. (1992) *Oncogene*, 7, 1513–1523.
- Tarunina, M., and Jenkins, J.R. (1993) *Oncogene*, 8, 3165–3173.
- Levine, A.J. (1990) *Bioessays*, 12, 60–66.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., and Lane, D.P. (1992) *Cell*, 71, 875–886.
- Rotter, V., Friedman, H., Katz, A., Zerivitz, K., and Wolf, D. (1983) *J. Immunol.*, 131, 329–333.
- Hupp, T.R., Sparks, A., and Lane, D.P. (1995) *Cell*, 83, 237–245.
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., and Iggo, R. (1996) *Oncogene*, 12, 921–930.

50. Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K.P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K.G. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 362-369.
51. Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S., and van de Woude, G.F. (1996) *Science*, **271**, 1744-1747.
52. Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A., and Bouck, N. (1994) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **59**, 483-489.
53. Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A., and Bouck, N. (1994) *Science*, **265**, 1582-1584.
54. Komarova, E.A., Diatchenko, L., Rokhlin, O.W., Hill, J.E., Wang, Z.J., Krivokrysenko, V.I., Feinstein, E., and Gudkov, A.V. (1998) *Oncogene*, **17**, 1089-1096.
55. Shaulian, E., Haviv, I., Shaul, Y., and Oren, M. (1995) *Oncogene*, **10**, 671-680.
56. Liu, X., Miller, C.W., Koeffler, P.H., and Berk, A.J. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3291-3300.
57. Cairns, C.A., and White, R.J. (1998) *EMBO J.*, **17**, 3112-3123.
58. Bargonetti, J., Chicas, A., White, D., and Prives, C. (1997) *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, **43**, 935-949.
59. Blagosklonny, M.V., An, W.G., Romanova, L.Y., Trepel, J., Fojo, T., and Neckers, L. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11995-11998.
60. Bhat, M.K., Yu, C., Yap, N., Zhan, Q., Hayashi, Y., Seth, P., and Cheng, S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 28989-28993.
61. Yu, C.L., Driggers, P., Barrera-Hernandez, G., Nunez, S.B., Segars, J.H., and Cheng, S. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 617-620.
62. Fritsche, M., Mundt, M., Merkle, C., Jahne, R., and Groner, B. (1998) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **143**, 143-154.
63. Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., and Reed, J.C. (1994) *Cancer Res.*, **54**, 3131-3135.
64. Ravi, R., Mookerjee, B., van Hensbergen, Y., Bedi, G.C., Giordano, A., El-Deiry, W.S., Fuchs, E.J., and Bedi, A. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 4531-4536.
65. Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M.M. (1992) *Science*, **255**, 459-462.
66. Agoff, S.N., Hou, J., Linzer, D.I., and Wu, B. (1993) *Science*, **259**, 84-87.
67. Guenal, I., Risler, Y., and Mignotte, B. (1997) *J. Cell. Sci.*, **110**, 489-495.
68. Murphy, M., Hinman, A., and Levine, A.J. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 2971-2980.
69. Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H., and Peters, G. (1998) *EMBO J.*, **17**, 5001-5014.
70. El-Deiry, W.S. (1998) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **227**, 121-137.
71. Waldman, T., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995) *Cancer Res.*, **55**, 5187-5190.
72. Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995) *Cell*, **82**, 675-684.
73. Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G.J. (1995) *Nature*, **377**, 552-557.
74. Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. (1994) *Nature*, **369**, 574-578.
75. Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bac, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M., and Fornace, A.J., Jr. (1994) *Science*, **266**, 1376-1380.
76. Zhan, Q., Kontny, U., Iglesias, M., Alamo, I., Jr., Yu, K., Hollander, M.C., Woodworth, C.D., and Fornace, A.J., Jr. (1999) *Oncogene*, **18**, 297-304.
77. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997) *Mol. Cell.*, **1**, 3-11.
78. Utrera, R., Collavin, L., Lazarevic, D., Delia, D., and Schneider, C. (1998) *EMBO J.*, **17**, 5015-5025.
79. Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995) *Cell*, **80**, 293-299.
80. Oltvai, Z.N., and Korsmeyer, S.J. (1994) *Cell*, **79**, 189-192.
81. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998) *Nature*, **391**, 496-499.
82. Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998) *Mol. Cell.*, **1**, 949-957.
83. McCurrach, M.E., Connor, T.M., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., and Lowe, S.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2345-2349.
84. Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., and Kruzel, E. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3032-3040.
85. Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R., and Weissberg, P. (1998) *Science*, **282**, 290-293.
86. Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G., and El-Deiry, W.S. (1997) *Nat. Genet.*, **17**, 141-143.
87. Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998) *Science*, **281**, 1305-1308.
88. Harrington, E.A., Fanidi, A., and Evan, G.I. (1994) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**, 120-129.
89. Leri, A., Liu, Y., Claudio, P.P., Kajstura, J., Wang, X., Wang, S., Kang, P., Malhotra, A., and Anversa, P. (1999) *Am. J. Pathol.*, **154**, 567-580.
90. Prisco, M., Hongo, A., Rizzo, M.G., Sacchi, A., and Baserga, R. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1084-1092.
91. Israeli, D., Tessler, E., Haupt, Y., Elkeles, A., Wilder, S., Amson, R., Telerman, A., and Oren, M. (1997) *EMBO J.*, **16**, 4384-4392.
92. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997) *Nature*, **389**, 300-305.
93. Yin, Y., Terauchi, Y., Solomon, G.G., Aizawa, S., Rangarajan, P.N., Yazaki, Y., Kadowaki, T., and Barrett, J.C. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 707-710.
94. Okamoto, K., and Beach, D. (1994) *EMBO J.*, **13**, 4816-4822.
95. Okamoto, K., and Prives, C. (1999) *Oncogene*, **18**, 4606-4615.
96. Nishimori, H., Shiratsuchi, T., Urano, T., Kimura, Y., Kiyono, K., Tatsumi, K., Yoshida, S., Ono, M., Kuwano, M., Nakamura, Y., and Tokino, T. (1997) *Oncogene*, **15**, 2145-2150.
97. Van Meir, E.G., Poverini, P.J., Chazin, V.R., Su Huang, H.J., de Tribolet, N., and Cavenee, W.K. (1994) *Nat. Genet.*, **8**, 171-176.
98. Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmuller, L., Grosse, F., and Deppert, W. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2155-2168.
99. Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmuller, L., Grosse, F., and Deppert, W. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 12-27.
100. Reisman, D., and Loging, W.T. (1998) *Semin. Cancer Biol.*, **8**, 317-324.
101. Reisman, D., Elkind, N.B., Roy, B., Beamon, J., and Rotter, V. (1993) *Cell. Growth Differ.*, **4**, 57-65.
102. Sun, X., Shimizu, H., and Yamamoto, K. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4489-4496.
103. Oren, M., Reich, N.C., and Levine, A.J. (1982) *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 443-449.
104. Reich, N.C., Oren, M., and Levine, A.J. (1983) *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2143-2150.
105. Caelles, C., Helmborg, A., and Karin, M. (1994) *Nature*, **370**, 220-223.
106. Maltzman, W., and Czyzyk, L. (1984) *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1689-1694.
107. Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F., and Deppert, W. (1995) *EMBO J.*, **14**, 4442-4449.



108. Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G.P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A.J., and Shenk, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 12028-12032.
109. Truant, R., Xiao, H., Ingles, C.J., and Greenblatt, J. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 2284-2287.
110. Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R., and Tjian, R. (1995) *Science*, 267, 100-104.
111. Lu, H., and Levine, A.J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5154-5158.
112. Grunstein, M. (1997) *Nature*, 389, 349-352.
113. Mizzen, C.A., and Allis, C.D. (1998) *Cell. Mol. Life Sci.*, 54, 6-20.
114. Struhl, K. (1998) *Genes Dev.*, 12, 599-606.
115. Gu, W., Shi, X.L., and Roeder, R.G. (1997) *Nature*, 387, 819-823.
116. Wadgaonkar, R., and Collins, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 13760-13767.
117. Janknecht, R., and Hunter, T. (1996) *Nature*, 383, 22-23.
118. Gu, W., and Roeder, R.G. (1997) *Cell*, 90, 595-606.
119. Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W., and Appella, E. (1998) *Genes Dev.*, 12, 2831-2841.
120. Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1202-1209.
121. Chen, C.Y., Oliner, J.D., Zhan, Q., Fornace, A.J., Jr., Vogelstein, B., and Kastan, M.B. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 2684-2688.
122. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997) *Nature*, 387, 296-299.
123. Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997) *Nature*, 387, 299-303.
124. Blaydes, J.P., Gire, V., Rowson, J.M., and Wynford-Thomas, D. (1997) *Oncogene*, 14, 1859-1868.
125. Bottger, A., Bottger, V., Sparks, A., Liu, W.L., Howard, S.F., and Lane, D.P. (1997) *Curr. Biol.*, 7, 860-869.
126. Leveillard, T., and Wasylyk, B. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 30651-30661.
127. Thut, C.J., Goodrich, J.A., and Tjian, R. (1997) *Genes Dev.*, 11, 1974-1986.
128. Chakravarti, D., Ogryzko, V., Kao, H.Y., Nash, A., Chen, H., Nakatani, Y., and Evans, R.M. (1999) *Cell*, 96, 393-403.
129. Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.U., and O'Connor, M.J. (1999) *J. Virol.*, 73, 6209-6219.
130. Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999) *EMBO J.*, 18, 1660-1672.
131. Freedman, D.A., and Levine, A.J. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, 18, 7288-7293.
132. Lain, S., Midgley, C., Sparks, A., Lane, E.B., and Lane, D.P. (1999) *Exp. Cell Res.*, 248, 457-472.
133. Roth, J., Dobbelsstein, M., Freedman, D.A., Shenk, T., and Levine, A.J. (1998) *EMBO J.*, 17, 554-564.
134. Tao, W., and Levine, A.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3077-3080.
135. Kubbutat, M.H., Ludwig, R.L., Levine, A.J., and Vousden, K.H. (1999) *Cell. Growth. Differ.*, 10, 87-92.
136. Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997) *FEBS Lett.*, 420, 25-27.
137. Grossman, S.R., Perez, M., Kung, A.L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z.X., Kumar, S., Howley, P.M., and Livingston, D.M. (1998) *Mol. Cell*, 2, 405-415.
138. Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R., and Ronai, Z. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10541-10546.
139. Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N., and Ronai, Z. (1998) *Genes Dev.*, 12, 2658-2663.
140. Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., and Kastan, M.B. (1997) *Genes Dev.*, 11, 3471-3481.
141. Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997) *Cell*, 91, 325-334.
142. Lees-Miller, S.P., Sakaguchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E., and Anderson, C.W. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, 12, 5041-5049.
143. Gottlieb, T.M., and Jackson, S.P. (1993) *Cell*, 72, 131-142.
144. Morozov, V.E., Falzon, M., Anderson, C.W., and Kuff, E.L. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 16684-16688.
145. Fiscella, M., Zambrano, N., Ullrich, S.J., Unger, T., Lin, D., Cho, B., Mercer, W.E., Anderson, C.W., and Appella, E. (1994) *Oncogene*, 9, 3249-3257.
146. Woo, R.A., McLure, K.G., Lees-Miller, S.P., Rancourt, D.E., and Lee, P.W. (1998) *Nature*, 394, 700-704.
147. Kachnic, L.A., Wu, B., Wunsch, H., Mekeel, K.L., DeFrank, J.S., Tang, W., and Powell, S.N. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 13111-13117.
148. Mayo, L.D., Turchi, J.J., and Berberich, S.J. (1997) *Cancer Res.*, 57, 5013-5016.
149. Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998) *Science*, 281, 1674-1677.
150. Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998) *Science*, 281, 1677-1679.
151. Lavin, M.F., and Shiloh, Y. (1997) *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 177-202.
152. Kastan, M.B., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., and Fornace, A.J., Jr. (1992) *Cell*, 71, 587-597.
153. Canman, C.E., Wolff, A.C., Chen, C.Y., Fornace, A.J., Jr., and Kastan, M.B. (1994) *Cancer Res.*, 54, 5054-5058.
154. Khanna, K.K., and Lavin, M.F. (1993) *Oncogene*, 8, 3307-3312.
155. Shiloh, Y. (1997) *Annu. Rev. Genet.*, 31, 635-662.
156. Xu, Y., and Baltimore, D. (1996) *Genes Dev.*, 10, 2401-2410.
157. Morgan, S.E., and Kastan, M.B. (1997) *Adv. Cancer Res.*, 71, 1-25.
158. Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S.P., and Lavin, M.F. (1998) *Nat. Genet.*, 20, 398-400.
159. Keegan, K.S., Holtzman, D.A., Plug, A.W., Christenson, E.R., Brainerd, E.E., Flagg, G., Bentley, N.J., Taylor, E.M., Meyn, M.S., Moss, S.B., Carr, A.M., Ashley, T., and Hoekstra, M.F. (1996) *Genes Dev.*, 10, 2423-2437.
160. Cliby, W.A., Roberts, C.J., Cimprich, K.A., Stringer, C.M., Lamb, J.R., Schreiber, S.L., and Friend, S.H. (1998) *EMBO J.*, 17, 159-169.
161. Lakin, N.D., Hann, B.C., and Jackson, S.P. (1999) *Oncogene*, 18, 3989-3995.
162. Shieh, S.Y., Taya, Y., and Prives, C. (1999) *EMBO J.*, 18, 1815-1823.
163. Kapoor, M., and Lozano, G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2834-2837.
164. Lu, H., Taya, Y., Ikeda, M., and Levine, A.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6399-6402.
165. Meek, D.W. (1998) *Cell Signal.*, 10, 159-166.
166. Wang, Y., and Prives, C. (1995) *Nature*, 376, 88-91.
167. Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., and Vousden, K.H. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1751-1758.
168. Blattner, C., Tobiasch, E., Litfen, M., Rahmsdorf, H.J., and Herrlich, P. (1999) *Oncogene*, 18, 1723-1732.
169. Waterman, M.J., Stavridi, E.S., Waterman, J.L., and Halazonetis, T.D. (1998) *Nat. Genet.*, 19, 175-178.
170. Hupp, T.R., and Lane, D.P. (1994) *Curr. Biol.*, 4, 865-875.
171. Takenaka, I., Morin, F., Seizinger, B.R., and Kley, N. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 5405-5411.
172. Chernov, M.V., Ramana, C.V., Adler, V.V., and Stark, G.R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2284-2289.

173. Lambert, P.F., Kashanchi, F., Radonovich, M.F., Shiekhhattar, R., and Brady, J.N. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 33048–33053.
174. Vassilev, A., Yamauchi, J., Kotani, T., Prives, C., Avantiaggiati, M.L., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998) *Mol. Cell.*, 2, 869–875.
175. Whitacre, C.M., Hashimoto, H., Tsai, M.L., Chatterjee, S., Berger, S.J., and Berger, N.A. (1995) *Cancer Res.*, 55, 3697–3701.
176. Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Luo, R., and Smulson, M.E. (1999) *Cancer Res.*, 59, 2190–2194.
177. Wang, X., Ohnishi, K., Takahashi, A., and Ohnishi, T. (1998) *Oncogene*, 17, 2819–2825.
178. Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Wang, Z.Q., Wagner, E.F., and Stark, G.R. (1997) *Oncogene*, 15, 1035–1041.
179. Shafman, T., Khanna, K.K., Kedar, P., Spring, K., Kozlov, S., Yen, T., Hobson, K., Gatei, M., Zhang, N., Watters, D., Egerton, M., Shiloh, Y., Kharbanda, S., Kufe, D., and Lavin, M.F. (1997) *Nature*, 387, 520–523.
180. Baskaran, R., Wood, L.D., Whitaker, L.L., Canman, C.E., Morgan, S.E., Xu, Y., Barlow, C., Baltimore, D., Wynshaw-Boris, A., Kastan, M.B., and Wang, J.Y. (1997) *Nature*, 387, 516–519.
181. Goga, A., Liu, X., Hambuch, T.M., Senechal, K., Major, E., Berk, A.J., Witte, O.N., and Sawyers, C.L. (1995) *Oncogene*, 11, 791–799.
182. Sionov, R.V., Moallem, E., Berger, M., Kazaz, A., Gerlitz, O., Ben-Neriah, Y., Oren, M., and Haupt, Y. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 8371–8374.
183. Yuan, Z.M., Huang, Y., Whang, Y., Sawyers, C., Weichselbaum, R., Kharbanda, S., and Kufe, D. (1996) *Nature*, 382, 272–274.
184. Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. (1997) *Cell*, 91, 649–659.
185. Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8292–8297.
186. Kamijo, T., Bodner, S., van de Kamp, E., Randle, D.H., and Sherr, C.J. (1999) *Cancer Res.*, 59, 2217–2222.
187. Kamijo, T., van de Kamp, E., Chong, M.J., Zindy, F., Diehl, J.A., Sherr, C.J., and McKinnon, P.J. (1999) *Cancer Res.*, 59, 2464–2469.
188. Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W.G. (1998) *Cell*, 92, 725–734.
189. Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., and dePinto, R.A. (1998) *Cell*, 92, 713–723.
190. Zhang, Y., and Xiong, Y. (1999) *Mol. Cell.*, 3, 579–591.
191. Tao, W., and Levine, A.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6937–6941.
192. Honda, R., and Yasuda, H. (1999) *EMBO J.*, 18, 22–27.
193. de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Lowe, S.W. (1998) *Genes Dev.*, 12, 2434–2442.
194. Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998) *Genes Dev.*, 12, 2424–2433.
195. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997) *Cell*, 88, 593–602.
196. Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. (1998) *Nature*, 395, 125–126.
197. Calabro, V., Parisi, T., di Cristofano, A., and la Mantia, G. (1999) *Oncogene*, 18, 2157–2162.
198. Robertson, K.D., and Jones, P.A. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6457–6473.
199. Ruas, M., and Peters, G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1378, F115–177.
200. Maestro, R., Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H., and Hannon, G.J. (1999) *Genes Dev.*, 13, 2207–2217.
201. Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A.J., Jr., and Giaccia, A.J. (1994) *Mol. Cell Biol.*, 14, 6264–6277.
202. Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W., and Giaccia, A.J. (1996) *Nature*, 379, 88–91.
203. Valenzuela, M.T., Nunez, M.I., Villalobos, M., Siles, E., McMillan, T.J., Pedraza, V., and Ruiz de Almodovar, J.M. (1997) *Int. J. Cancer*, 72, 307–312.
204. Tishler, R.B., Lamppu, D.M., Park, S., and Price, B.D. (1995) *Cancer Res.*, 55, 6021–6025.
205. Sablina, A.A., Ilyinskaya, G.V., Rubtsova, S.N., Agapova, L.S., Chumakov, P.M., and Kopnin, B.P. (1998) *J. Cell. Sci.*, 111, 977–984.
206. Nikiforov, M.A., Hagen, K., Ossovskaya, V.S., Connor, T.M., Lowe, S.W., Deichman, G.I., and Gudkov, A.V. (1996) *Oncogene*, 13, 1709–1719.
207. An, W.G., Kanekal, M., Simon, M.C., Maltepe, E., Blagosklonny, M.V., and Neckers, L.M. (1998) *Nature*, 392, 405–408.

## THE FUNCTION OF THE p53 GENE: A CHOICE BETWEEN LIFE AND DEATH

P.M. Chumakov

V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,  
ul. Vavilova 32, Moscow, 117984; fax: (095)135-1405, E-mail: chumakov@imb.ac.ru

Submitted October 5, 1999

p53 gene is a central component of a mechanism that purges pathologic cells from the organism. Multiple signaling pathways are involved in the process of monitoring the state of a cell. In case of a damage, or faults that threaten acquisition of inheritable changes in the genome, the existing mechanisms induce activation of p53 protein that either coordinates reparation processes, or forces the cell to commit suicide. The p53 gene thus plays a role of supreme judge that rules the fate of cells thus warranting their social behavior. Loss of the p53 gene results in uncontrolled accumulation of genetic changes leading to loss of control from the organism, malignant growth and death.

**KEY WORDS:** tumor suppressor, oncogene, cell cycle, apoptosis, genetic stability, transcription, protein conformation.

УДК 576.385.5

## СУПРЕССИЯ p53: НОВЫЙ ПОДХОД К ПРЕОДОЛЕНИЮ ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

### Обзор

© 2000 г. Е.А. Комарова, А.В. Гудков\*

Отдел молекулярной генетики Иллинойского университета,  
Чикаго, Иллинойс 60607, США; факс: (312)996-0683, электронная почта: gudkov@uic.edu

Поступила в редакцию 17.09.99

Белок p53 традиционно считается опухолевым супрессором. Активация p53-зависимого апоптоза в ответ на повреждение клеточной ДНК способствует удалению потенциальных предшественников опухолевых клеток. Однако в особых случаях активность p53 может оказаться опасной для организма. Например, p53-зависимый апоптоз, индуцируемый в нормальных тканях при химио- и радиотерапии, может стать причиной тяжелых побочных эффектов противоопухолевой терапии, таким образом ограничивая их эффективность. В обзоре проанализированы экспериментальные данные о роли p53 в первичном и отдаленном ответах тканей на ДНК-повреждающие воздействия. Сравнение нормальных и p53-дефицитных мышей показало, что апоптоз, происходящий в первые часы после облучения в радиочувствительных тканях, в самом деле определяется активностью p53, которая, в свою очередь, обусловлена высоким уровнем экспрессии мРНК p53. Мы предположили, что временная супрессия p53 может снизить повреждения чувствительных тканей и ускорить их восстановление после применения противоопухолевой радио- и химиотерапии. Для проверки этой гипотезы мы выделили химический ингибитор p53 и охарактеризовали его активность *in vitro* и *in vivo*. Это соединение, названное пифитрином-α, обладает способностью защищать мышей дикого типа от летальных доз радиации, не оказывая влияния на p53-дефектных животных и не вызывая видимой индукции опухолей. Эти результаты показывают, что супрессию p53 можно рассматривать как терапевтический метод борьбы с побочными эффектами противоопухолевой терапии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** p53, апоптоз, противоопухолевая терапия.

Белок p53 – ключевой элемент контроля клеточного ответа на различные виды стресса: активация p53 в ответ на стресс приводит к остановке пролиферации или апоптозу. p53, таким образом, осуществляет важную «социальную» функцию в многоклеточном организме, удаляя поврежденные и, следовательно, потенциально опасные клетки, вынуждая их отдать собственную жизнь ради безопасности организма. Инактивация p53, наблюдаемая в большинстве опухолей, свидетельствует в пользу его противоопухолевой активности. Именно поэтому инактивация p53 традиционно рассматривается как нежелательное и опасное событие. Много усилий было направлено на попытки восстановления его функции в опухолях в терапевтических целях. Однако здесь мы рассмотрим роль p53 в организме с иной точки зрения, помня, что его активность не ограничена опухолевыми клетками. Мы рассмотрим факты, указывающие на участие p53 в регуляции ответа нормальных тканей на повреждающие воздействия, особо обращая внимание на его роль в развитии побочных эффектов при противораковой терапии.

Эффективность радио- и химиотерапии ограничена тяжелыми осложнениями, связанными с повреждением ряда чувствительных тканей, включая кроветворную и иммунную системы, разные виды эпителия (особенно тонкого кишечника) и клетки репродуктивной системы. В том случае, если p53 участвует в индукции этих повреждений, его можно рассматривать как мишень для терапевтической супрессии, которая могла бы снизить нежелательные эффекты. Очевидно, такой подход может быть применен для лечения лишь тех опухолей, которые утратили функцию p53 и для которых такая супрессия не должна иметь нежелательных последствий.

Мы начнем с краткого обзора молекулярных механизмов активации p53, затем перейдем к описанию функции этого белка в опухолевой супрессии, в нормальном развитии и дифференцировке с тем, чтобы постараться предсказать потенциальные осложнения, которые могут возникнуть при попытке подавления p53. Затем мы рассмотрим изменения, происходящие в нормальных тканях в ответ на повреждения ДНК, и роль p53 в индукции этих эффектов. В частности, будут рассмотрены следующие вопросы.

\*Адресат для корреспонденции и запросов отписков.

Связаны ли побочные эффекты противоопухолевой терапии с активацией p53?

Почему p53-зависимые эффекты, вызываемые генотоксическими воздействиями, тканеспецифичны?

Как p53 влияет на способность нормальных тканей регенерировать после стресса?

Какие последствия может иметь временное подавление p53 во время острого периода противоракового лечения?

Какие осложнения могут возникнуть в результате применения терапевтической супрессии p53?

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВНОСТИ p53

Активация p53 происходит в ответ на различные типы стресса [1], включая повреждения ДНК химическими и физическими агентами (генотоксический стресс) [2, 3], нарушение регуляции сборки/разборки микротрубочек [4], активацию онкогенов [5], гипоксию [6], гипертермию [7] и др. (см. ниже). Активация p53 приводит либо к остановке клеточного цикла в одном из его «сверочных точек», либо к индукции апоптоза. Выбор между этими возможностями зависит от типа клеток и характера стресс-сигнала. Например, если тимоциты в результате повреждения ДНК гибнут от быстрого апоптоза [8, 9], то фибробласты оказываются необратимо «арестованными». Примером, когда характер стресса определяет вид p53-зависимого ответа, является линия лимфоидных клеток человека Vaf-3. В присутствии интерлейкина-3  $\gamma$ -облучение Vaf-3 приводит к блокированию клеточного цикла, в отсутствие цитокина это же воздействие вызывает апоптоз [10, 11].

**Механизмы активации p53.** Активация p53 преимущественно регулируется на посттрансляционном уровне. В ответ на стресс происходит стабилизация белка p53, что, по крайней мере частично, регулируется фосфорилированием p53 несколькими клеточными протеинкиназами [12–14]. Индукция p53 в ответ на активацию доминантными онкогенами происходит по иному механизму, включающему взаимодействие p53 с рядом регуляторных белков (см. ниже). Накопленная информация о молекулярных механизмах активации p53 суммирована в нескольких недавних обзорах [1, 12, 15].

Стабилизация p53 ведет к его накоплению в ядре, где он связывается со специфическими последовательностями ДНК, модулируя транскрипцию (усиливает или ослабляет) ряда p53-регулируемых генов. Активность этих генов объ-

ясняет, по крайней мере частично, клеточный ответ на стресс. Например, p53-зависимая индукция ингибитора циклинзависимых киназ p21/Waf-1 [16] ведет к остановке в G1. Другой p53-зависимый фактор – ядерный белок 14-3-3- $\sigma$  [17] – играет роль в задержке клеточного цикла в G2. p53-Регулируемый ген *bax* принимает участие в активации p53-зависимого апоптоза [18]. Однако механизмы p53-зависимых клеточных эффектов не ограничиваются эффектами p53 на транскрипцию. Мутанты p53, дефектные по транскрипционной активации, в некоторых клеточных системах способны индуцировать апоптоз, указывая на то, что p53 вовлечен и в другие, до сих пор неизученные механизмы клеточной регуляции [19].

**Регуляция p53.** Регуляция p53-зависимого ответа включает взаимодействие p53 с несколькими клеточными белками, включая Mdm2, p19ARF, CBP/p300, p33ING1, Ref-1 [20–27] и др. Mdm2 – важный негативный регулятор p53, который кодируется p53-индуцибельным геном. Связываясь с p53, белок Mdm2 стимулирует экспорт p53 из ядра и ускоряет его протеасомную деградацию [26, 27]. p19ARF индуцируется вместе с p53 в ответ на трансформацию доминантными онкогенами. Он связывается с Mdm2, приводя к накоплению p53 и индукции p53-зависимого ответа [20]. CBP/p300 [21, 22] и p33ING1 [23] принимают участие в активации p53-зависимой транскрипции. p53-Связывающий белок Ref-1 вовлечен в индукцию p53-зависимого апоптоза [24, 25].

p53 также регулируется и на уровне ядерного транспорта. Накопление p53 в ядре ограничивается «окном» в G1-ранней S-фазе клеточного цикла, препятствуя модуляции p53-регулируемых генов вне этого «окна» [28]. Кроме того, транспорт p53 в ядро блокирован в ранних эмбриональных клетках [29] и в нейробластомах [30], что приводит к его функциональной инактивации. Молекулярные механизмы этих явлений пока неясны.

### РОЛЬ p53 В НОРМАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

Для того чтобы оценить, насколько супрессия p53 может быть опасной для нормального организма, выясним, что известно о нормальной функции этого белка и о патологических последствиях его дефицита.

**p53 и спонтанный канцерогенез.** Токсичность экспрессии p53 для многих опухолевых клеток, функциональная инактивация p53, происходящая в большинстве опухолей, свидетельствуют о его противоопухолевой активности. Прямой

иллюстрацией активности p53 как опухолевого супрессора является фенотип мышей с генетически инактивированным p53 (нокаутом p53). Инактивация p53 сопряжена с резким увеличением частоты спонтанных опухолей у гомозиготных и даже гетерозиготных по «нокаутному аллелю» животных. Гомозиготные «нокауты» погибают в течение первых 6 месяцев преимущественно от лимфом. У гетерозиготных животных возникают разные типы опухолей, среди которых наиболее часты саркомы и лимфомы [31, 32]. Высокая частота опухолей у p53-дефицитных животных объясняется, по-видимому, тем, что у них в результате отсутствия p53 нарушен механизм, препятствующий накоплению спонтанно мутирующих клеток, вероятно, путем необратимой остановки клеточного цикла или индукции апоптоза. Накопление таких клеток создает клеточную популяцию с высоким риском спонтанной трансформации. В самом деле соматические клетки p53-нокаутных мышей характеризуются исключительно высокой частотой хромосомных aberrаций [33]. Зависимость клеточного контроля геномной стабильности от p53 была впервые экспериментально продемонстрирована в опытах по индукции генной амплификации супрессорами p53 [34, 35]. Противоопухолевая активность p53 проявляется и в его реакции на активацию доминантных онкогенов. Например, экспрессия в фибробластах активированного *ras*, *тус*, *E1A* приводит к индукции p53 и необратимой остановке клеточной пролиферации, напоминающей преждевременное старение [5, 36]. Активация p53 при этом требует экспрессии опухолевого супрессора p19ARF [37].

**p53 и репликативное старение.** Контроль репликативного старения – еще один важный механизм антиопухолевой активности p53. Естественный процесс клеточного старения заканчивается необратимой остановкой роста после определенного числа делений. Инактивация p53 ведет к нарушению этого процесса. Например, фибробласты из p53-нокаутных мышей не стареют в культуре, продолжая неограниченно пролиферировать [38]. При выведении immortalized клеточных линий p53 часто специально инактивируют, экспрессируя онкобелки ДНК-содержащих вирусов. Необратимая остановка пролиферации старых клеток сопровождается p53-зависимой транскрипционной активацией генов-мишеней p53 [39]. Активация p53 в старых клетках, по-видимому, происходит в ответ на хромосомные разрывы, ассоциированные с укорочением теломер в стареющих клетках [40].

**p53 и опухолевая прогрессия.** Статус p53 в значительной степени определяет свойства опухолей. Сохранность в опухолях p53 дикого типа

является положительным прогностическим маркером в опухолях толстой кишки, молочных желез, мочевого пузыря и др. [41–49]. Интактность p53 обычно является характеристикой менее агрессивных опухолей, чувствительных к противоопухолевой терапии [50]. p53 также снижает частоту появления метастатических вариантов опухоли, по-видимому, препятствуя накоплению дополнительных мутаций – необходимому условию опухолевой прогрессии [51]. Более того, p53 является антиангиогенным фактором, активируя транскрипцию тромбоспондинов 1 и 2, известных как супрессоры ангиогенеза [52–54].

**p53 и секретируемые регуляторы роста.** Действие p53 не ограничивается его непосредственным влиянием на пролиферацию поврежденных клеток. Активация p53 индуцирует секрецию ростовых ингибиторных факторов поврежденными клетками, действующих на пролиферацию окружающих клеток. p53-Зависимые факторы, ингибирующие рост ряда клеточных линий, были обнаружены в культуральной среде перевивных и первичных клеточных культур после  $\gamma$ -облучения, а также в моче облученных мышей [55]. Кроме антиангиогенных факторов список генов-мишеней p53 включает и другие известные ростовые супрессоры (IGBP-3, TGF- $\beta$ 2, ингибин- $\beta$ , ингибиторы сериновых протеаз) [55]. Природа p53-зависимых ростовых ингибиторов остается неизвестной. p53-Зависимая секреция стрессзависимых ростовых ингибиторных факторов, возможно, определяет известный эффект («bystander effect»), наблюдаемый при генной терапии [56], когда масштаб клеточной гибели значительно превышает количество клеток, непосредственно экспрессирующих экзогенный p53. Действительно, смерть опухолевых клеток в ответ на индукцию химиотерапевтическими средствами становится более эффективной, если клетки растут в смеси с фибробластами, экспрессирующими дикий тип p53, в то время как p53-дефектные фибробласты таким свойством не обладают [55].

**p53 и нормальное развитие.** Фенотип мышей, дефектных по p53, не ограничивается высокой частотой спонтанных опухолей. Хотя развитие большинства p53-дефектных эмбрионов происходит нормально [31, 32], у значительной части самок (23%) развиваются экзенцефалия и далее анэнцефалия в результате неправильного закрытия нервной трубки [57, 58]. Среди других дефектов у p53-дефектных эмбрионов часто наблюдается неправильное развитие зубов и глаз [57, 59].

Кроме того, отсутствие p53 отражается на дифференцировке некоторых типов клеток [60]. Например, белая пульпа значительно увеличена



у p53-негативных мышей, а в костном мозге у них увеличена пропорция незрелых В-клеток [61]. Есть сведения и о возможном участии p53 в дифференцировке тимоцитов [62]. Было продемонстрировано участие p53 в дифференцировке нейронов и олигодендроцитов [63]. Предполагаемая роль p53 в процессе сперматогенеза основана на данных о циклической экспрессии p53 в тетраплоидных первичных сперматоцитах [64] и измененном соотношении стволовых и дифференцированных клеток в сперматогониях p53-дефектных мышей [65]. Подавление активности p53 у эмбрионов *Xenopus laevis* блокирует дифференцировку ранних бластомеров [66]. Все эти наблюдения говорят об участии p53 в дифференцировке и морфогенезе многих клеточных типов и тканей, хотя механизм этого участия остается неизвестен.

Подводя итог, мы можем сформулировать три основные функции, которые p53 выполняет в нормальном организме. Первая связана с его ролью «охранника генома», приводящая к устранению потенциально опасных клеток в эмбриональном развитии и в пролиферирующих взрослых тканях; эта функция, вероятно, вовлечена и в контроль клеточного старения и объясняет способность p53 увеличивать эффективность антираковой терапии. Вторая функция p53 – это контроль клеточной кооперации, осуществляемой через секрецию антипролиферативных факторов; эта функция, вероятно, связана с процессами тканевого старения, реакцией на стресс и взаимодействием между нормальной и опухолевой тканями. Третьей функцией p53 является его включение в дифференцировку и морфогенез.

### p53 ОПРЕДЕЛЯЕТ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТКАНЕЙ И ЭМБРИОНОВ

**Активность p53 *in vivo*.** Чтобы проследить за активностью p53 *in vivo*, три года назад три группы исследователей независимо получили трансгенных мышей, содержащих ген *lacZ* под p53-респонсивным промотором [67–69]. Активность p53 в тканях таких мышей можно детектировать по голубой окраске (цветной тест на  $\beta$ -галактозидазу), соответствующей местам p53-зависимой индукции трансгена [67–69]. Используя «голубых» мышей, показали, что после облучения или инъекции адриамицина происходит сильная локальная активация трансгена в селезенке, тимусе, тонком кишечнике, а также у ранних эмбрионов, в то время как в большинстве тканей p53-зависимый трансген не активируется.

Интересно, что именно те ткани, в которых p53 активен, являются наиболее чувствительными к радиации и химиотерапии и их повреждение может приводить к тяжелым побочным эффектам противоопухолевой терапии. Таким образом, p53-зависимая активация трансгена картировала радиочувствительные ткани мыши.

Корреляция между радиочувствительностью и активностью p53 была также найдена и у мышиных эмбрионов. Уже давно было известно, что ранние эмбрионы млекопитающих высокочувствительны к  $\gamma$ -радиации. Ситуация резко меняется во время органогенеза (8–13 дней) и поздние эмбрионы не отличаются по чувствительности к радиации от взрослых тканей [70]. В наших экспериментах индукция трансгена и уровень апоптоза после  $\gamma$ -облучения координированно уменьшались к середине эмбрионального развития. Более того, p53<sup>-/-</sup> эмбрионы оказались значительно более устойчивыми к радиации по сравнению с их p53<sup>+/+</sup> близнецами [67]. Таким образом, молекулярной основой для хорошо известного феномена высокой чувствительности ранних эмбрионов млекопитающих к облучению является повышенная активность у них p53.

Различие в активности p53, обнаруживаемое в разных типах тканей, может иметь большое биологическое значение. Высокая активность p53, вероятно, служит защитным механизмом, действующим в быстро пролиферирующих тканях, чтобы препятствовать накоплению генетически поврежденных клеток. Действительно, причиной ускорения образования лимфом у p53-дефицитных мышей после  $\gamma$ -облучения [71] может быть накопление поврежденных клеток, которые у нормальных мышей элиминируются с помощью p53-зависимого апоптоза. Кроме того, высокая выживаемость эмбрионов у p53-дефицитных мышей после облучения коррелирует с появлением у них многочисленных дефектов развития. Неправильные закладки органов происходят, видимо, из генетически поврежденных клеток, которые сохраняются у p53-дефицитных животных [72]. Эти наблюдения побудили Д. Лейна назвать p53 хранителем младенцев [73].

Радиочувствительность коррелирует с увеличенной экспрессией белка p53. Почему активность p53 после стресса наблюдается только в некоторых тканях? Что происходит в середине эмбриогенеза, когда эмбрионы, ранее чувствительные к облучению, становятся к нему устойчивы? Анализ p53 в разных мышечных органах показал, что, несмотря на то, что в каждой анализируемой ткани происходит стабилизация белка p53, количество этого белка в тканях резко варьирует. В радиочувствительных тканях

количество стабилизированного белка p53 гораздо выше, чем в радиоустойчивых [69]. Этот факт также подтверждают эксперименты, проведенные на опухолевых клеточных линиях *in vitro* [74–76] и на мышинных тканях тонкого и толстого кишечника *in vivo* [77]. Таким образом, количество белка p53 в ткани может определять, каков будет ее ответ на генотоксический стресс.

Интересное наблюдение, иллюстрирующее это предположение, было сделано при сравнении p53+/- и p53+/+ мышей, экспрессирующих p53-зависимый ген *lacZ* [68]. Оказалось, что снижение активации трансгена у облученных p53+/- по сравнению с p53+/+ мышами была значительно сильнее, чем это можно было ожидать при двукратном снижении дозы гена. Этот феномен, вероятно, объясняется тем, что p53 активен в виде тетрамера и двукратное снижение клеточной концентрации белка резко понижает вероятность формирования активного комплекса. Следовательно, низкие уровни экспрессии p53 в большинстве тканей, вероятно, могут быть причиной их радиоустойчивости.

**Регуляция p53 на уровне мРНК.** Накопление p53 в нормальных тканях после обработки ДНК-повреждающими воздействиями коррелирует с уровнями тканевой экспрессии p53 мРНК. По-видимому, концентрация мРНК p53 в ткани определяет эффективность накопления стабилизированного белка p53. Радиочувствительные ткани селезенки и тимуса экспрессируют во много раз больше мРНК p53, чем радиоустойчивые ткани печени, мозга, мышц ([78] и неопубликованные наблюдения Е.А. Комаровой и др.). Кроме того, высокий уровень экспрессии мРНК p53, наблюдаемый в эмбрионах первой половины беременности, значительно снижается во второй ее половине [78, 79], что коррелирует с различиями в радиочувствительности ранних и поздних эмбрионов. Учитывая, что эта чувствительность зависит от функции p53, весьма вероятно, что уже именно уровень мРНК p53 и определяет судьбу ткани после облучения. Следовательно, регуляция p53 на уровне мРНК играет существенную роль в определении его эффектов *in vivo*.

Интересно, что регуляции p53 на уровне мРНК до сих пор не уделялось должного внимания, считая, что основная регуляция осуществляется на посттрансляционном уровне. Поэтому вопрос о механизмах, поддерживающих дифференциальную экспрессию p53 мРНК в тканях, остается открытым.

Различие в уровнях мРНК p53 – не единственный способ регуляции тканевой специфичности эффектов p53, которая может зависеть от любого из участников сигнального пути p53.

Используя технологию анализа генной экспрессии с помощью микрочипов, мы сравнили спектр генов, индуцируемых в ответ на облучение, в радиочувствительных (селезенка, тимус) и радиоустойчивых (печень) тканях мышей – p53+/+ и p53-/- [55]. Многие из идентифицированных p53-индуцибельных генов оказались тканеспецифичными [55].

**p53-Зависимый и p53-независимый апоптоз.** Массовый апоптоз, происходящий в радиочувствительных тканях мышей с p53 дикого типа вскоре после облучения, не наблюдается у p53-негативных животных, указывая на определяющую роль p53 в первичном ответе организма на  $\gamma$ -радиацию [67, 80–82]. Однако за первой p53-зависимой волной клеточной смерти часто следует вторая волна p53-независимого апоптоза [81, 83, 84], которая выравнивает различия в радиационном повреждении тканей. Например, в клетках костного мозга мышей через 4 ч после облучения 6Gy трехкратные различия в уровне апоптоза наблюдались между клетками p53+/+ и p53-/- . Однако через 8 ч в клетках p53-/- уровень апоптоза возрастал [81]. Выраженность p53-независимого апоптоза сильно зависит от применяемой дозы радиации. Например, в тонком кишечнике p53-независимый апоптоз почти не обнаруживается после облучения 1Gy и ярко выражен у мышей, получивших 8Gy [83].

**p53 и восстановление ткани после генотоксического стресса.** p53 увеличивает повреждения радиочувствительных тканей, вызывая острый апоптоз после генотоксического стресса. Как влияет p53 на восстановление тканей после стресса? Зависит ли апоптоз в стволовых клетках от p53? Чтобы ответить на эти вопросы, рассмотрим результаты, полученные на нескольких типах тканей.

Выживаемость гематопозитических мультипотентных стволовых клеток и комитированных предшественников после облучения может быть оценена с помощью клоногенного метода на клетках селезенки, а кроме того, и с помощью определения степени восстановления кроветворения. Мультипотентные стволовые клетки и более дифференцированные колонииобразующие клетки, взятые от p53-дефицитных мышей, значительно устойчивее к радиации и химиотерапевтическим средствам, чем сходные клетки от животных с диким типом p53 [85, 86]. То же самое было показано для фибробластоидных предшественников в клетках костного мозга. Основываясь на этих наблюдениях, можно заключить, что восстановление гематопозитических клеток [86] после генотоксического стресса должно быть более эффективным в отсутствие p53.

Анализ экспериментальных данных о клоногенной выживаемости клеток других радиочувствительных тканей после облучения привел нас к неожиданному выводу. Несмотря на огромные различия в степени радиационно-индуцированного апоптоза в эпителии тонкой кишки, кожи и тестикулярных клеток у p53-дефицитных мышей и мышей с диким типом p53, отдаленная выживаемость клоногенных клеток, ответственных за восстановление этих тканей, почти не зависит от их p53-статуса [65, 82, 87, 88]. Восстановление сперматогоний было даже замедлено у p53-дефицитных мышей [65, 89]. Дифференцированные кератиноциты кожи с «диким» p53 в 5 раз чувствительнее к УФ-индуцированному апоптозу по сравнению с p53-дефицитными клетками. В то же время индукция апоптоза в недифференцированных клетках эпидермального базального слоя не зависела от p53 [88]. Разница зависимости индукции апоптоза от p53 была обнаружена также между дифференцированными и стволовыми клетками в эпителии толстого и тонкого кишечника. Хотя острый апоптоз в дифференцированных клетках зависел от функции p53, восстановление этих тканей из стволовых клеток после облучения не зависело от статуса p53. Известно, что стволовые клетки эпителия толстой кишки более радиостойчивы, а значит, должны быть менее зависимы от p53 по сравнению со стволовыми клетками эпителия тонкого кишечника [87]. Это различие может быть причиной большей частоты вторичного образования опухолей в толстой кишке по сравнению с тонкой после применения радио- и химиотерапии. Возможно, что апоптоз поврежденных клеток в толстой кишке, связанный со сниженной p53-зависимостью этой ткани, приводит к повышенному риску трансформации клеток. Почему зависимость от p53 гораздо сильнее выражена у дифференцированных клеток по сравнению со стволовыми? Можно предположить, что в стволовых клетках не индуцируется p53-зависимый апоптоз по той причине, что большинство из них не пролиферирует. Дифференцированные и дифференцирующиеся клетки находятся в состоянии пролиферации, что может объяснять их высокую чувствительность к повреждениям ДНК и сильную p53-зависимость. Однако защита ранних предшественников от p53-зависимой смерти может быть отражением более общего феномена, который проявляется также и в раннем эмбриогенезе. В недифференцированных стволовых эмбриональных клетках *in vitro* и ранних эмбрионах *in vivo* было обнаружено ингибирование индукции p53, механизмом которого может быть ограничение ядерного транспорта p53 [29].

Суммируя изложенные данные, можно заключить, что в первые часы после генотоксического стресса p53 выполняет роль убийцы дифференцирующихся клеток радиочувствительных тканей и, кроме того, стволовых клеток гематопозитической системы. Можно предположить, что временная супрессия p53 должна уменьшить повреждения радиочувствительных тканей, вызванных p53-зависимым апоптозом.

### ОПАСНО ЛИ ИНГИБИРОВАТЬ АКТИВНОСТЬ p53?

Как следует из анализа накопленных экспериментальных данных, причиной быстрой смерти клеток радиочувствительных органов в течение первых часов после γ-облучения является p53-зависимый апоптоз. Химиотерапия с применением ДНК-повреждающих агентов (доксорубин, фторурацил, цитозин арабинозид, цисплатина, эпозид и т.д.) и других индукторов p53 (винка-алкалоиды), по-видимому, ведет к сходным последствиям. Мы предположили, что временное подавление функции p53 в течение первых часов после генотоксического стресса может уменьшить повреждение нормальных тканей, вызванное противоопухолевой терапией, способствуя сохранению тех клеток, которые смогли редуцировать повреждение в течение того времени, когда p53 был «выключен». Очевидно, что этот подход может быть применим только при лечении p53-дефицитных опухолей, так как их чувствительность к терапии не должна измениться в присутствии p53 ингибиторов.

Достаточно ли имеющаяся информация, чтобы обосновать принцип супрессии p53 в противоопухолевой терапии? Мы суммируем имеющиеся «за» и «против» аргументы в форме полемики двух точек зрения: *пессимистической* (П) и *оптимистической* (О).

П – Потеря p53 в опухолях ассоциируется с ускорением их прогрессии и устойчивости к химиотерапии. Супрессия p53 может привести к тем же изменениям в опухолях.

О – Более, чем 50% опухолей человека не имеют функционального p53. Супрессия p53 не должна сказываться на эффективности лечения таких опухолей. Более того, в некоторых опухолях нарушение функции p53 связано с увеличением чувствительности к противоопухолевой терапии [90]. Таким образом, ингибирование p53 в таких случаях может даже повысить лечебный эффект противоопухолевой терапии.

П – Дефицит p53 связан с высоким риском образования спонтанных опухолей. Супрессия

p53 во время противоопухолевой терапии может привести к выживанию генетически измененных клеток в радиочувствительных тканях, которые в норме были бы удалены в результате p53-зависимого апоптоза. Это может повысить риск возникновения новых опухолей.

О – За исключением кроветворных стволовых клеток, чувствительность к p53-зависимому апоптозу характерна для дифференцирующихся и дифференцированных клеток радиочувствительных тканей; выживаемость клоногенных клеток не зависит от p53. Это означает, что супрессия p53 не должна отразиться на количестве генетически измененных клеток среди выживших стволовых клеток и, следовательно, применение этой терапии не приведет к увеличению риска появления вторичных опухолей. Уже в течение многих лет при химиотерапии используют ростовые колоннестимулирующие факторы, как считают, для стимуляции восстановления кроветворения. Однако их терапевтический эффект скорее всего связан с ингибированием p53-зависимого апоптоза [91], происходящим в результате активации сигнальных путей, ответственных за выживание клеток («survival pathways»).

П – p53 определяет только быстрый тканевой ответ на генотоксический стресс, вторая волна p53-независимого апоптоза элиминирует различия в повреждении тканей у животных с диким типом и дефектным p53.

О – Это справедливо только для высоких доз химио- и радиотерапии. После низких или средних доз радиации вторая волна апоптоза не выражена. Это свидетельствует о том, что супрессия p53 при таких дозах может иметь защитный эффект для организма.

П – Степень выживаемости стволовых клеток в кишечном эпителии и в сперматогониях не зависит от статуса p53. Это означает, что регенерация тканей не может улучшиться за счет супрессии p53.

О – Регенерация ткани происходит из стволовых клеток и занимает длительное время. Супрессия апоптоза в популяции комитированных

предшественников и дифференцированных клеток с помощью подавления функции p53 может поддержать нормальную функцию ткани в процессе регенерации.

### ХИМИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОР p53 ЗАЩИЩАЕТ МЫШЕЙ ОТ ЛЕТАЛЬНЫХ ДОЗ РАДИАЦИИ

Во время работы над этим обзором у нас еще не было данных, которые бы экспериментально подтверждали возможность применения супрессии p53 с целью уменьшения радио- и химиотерапевтических повреждений нормальных тканей во время противоопухолевого лечения. Однако недавно нам удалось идентифицировать химическое соединение пифитрин-α (ПФТ-α), способное подавлять функцию p53. Для поиска ингибиторов p53 мы использовали «библиотеку» из 10 000 случайно выбранных химических соединений, компоненты которой были тестированы на ранее полученных клетках CopA, использованных в качестве системы скрининга. Эти клетки содержат бактериальный ген *lacZ* под контролем p53-регулируемого промотора. Активация этого гена (детектируемая по голубой окраске с помощью X-gal), происходит в ответ на повреждения ДНК, вызванные облучением или обработкой химиотерапевтическими агентами. Мы выделили ряд соединений, которые блокировали активацию *lacZ* в клетках CopA, одно из которых было детально охарактеризовано. Используя ПФТ-α, мы обнаружили, что временное подавление p53 *in vitro* ингибирует апоптоз в чувствительных клетках, вызванный повреждением ДНК, повышая долю клеток, переживающих стресс. Тестирование ПФТ-α *in vitro* показало, что однократная инъекция препарата защищала 100% мышей от 60%-ной летальной радиационной дозы [92]. Какое место ПФТ-α занимает в p53-сигнальном пути, пока не вполне ясно. Возможно, механизм его действия связан с нарушением ядерного транспорта p53.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gottlieb, T.M., and Oren, M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1287, 77–102.
2. Maltzman, W., and Czyzyk, L. (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1689–1694.
3. Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R.W. (1991) *Cancer Res.*, 51, 6304–6307.
4. Tishler, R.B., Lamppu, D.M., Park, S., and Price, B.D. (1995) *Cancer Res.*, 55, 6021–6025.
5. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997) *Cell*, 88, 593–602.
6. Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W., and Giaccia, A.J. (1996) *Nature*, 379, 88–91.
7. Valenzuela, M.T., Nunez, M.I., Villalobos, M., Siles, E., McMillan, T.J., Pedraza, V., and Ruiz de Almodovar, J.M. (1997) *Int. J. Cancer.*, 72, 307–312.
8. Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., and Wyllie, A.H. (1993) *Nature*, 362, 849–852.
9. Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., and Jacks, T. (1993) *Nature*, 362, 847–849.

10. Canman, C.E., Gilmer, T.M., Coutts, S.B., and Kastan, M.B. (1995) *Genes Dev.*, 9, 600–611.
11. Gottlieb, E., and Oren, M. (1998) *EMBO J.*, 17, 3587–3596.
12. Ko, L.J., and Prives, C. (1996) *Genes Dev.*, 10, 1054–1072.
13. Morgan, S.E., and Kastan, M.B. (1997) *Adv. Cancer Res.*, 71, 1–25.
14. Woo, R.A., McLure, K.G., Lees-Miller, S.P., and Rancourt, D.E. (1998) *Nature*, 394, 700–704.
15. Canman, C.E., and Kastan, M.B. (1996) *Nature*, 384, 213–214.
16. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993) *Cell*, 75, 817–825.
17. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997) *Mol. Cell*, 1, 3–11.
18. Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995) *Cell*, 80, 293–299.
19. Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Kazaz, A., Vousden, K., and Oren, M. (1997) *Leukemia*, 3, 337–339.
20. Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., and dePinho, R.A. (1998) *Cell*, 92, 713–723.
21. Gu, W., Shi, X.L., and Roeder, R.G. (1997) *Nature*, 387, 819–823.
22. Lill, N.L., Grossman, S.R., Ginsberg, D., de Caprio, J., and Livingston, D.M. (1997) *Nature*, 387, 823–827.
23. Garkavtsev, I., Grigorian, I.A., Ossovskaia, V.S., Chernov, M.V., Chumakov, P.M., and Gudkov, A.V. (1998) *Nature*, 391, 295–298.
24. Jayaraman, L., Murthy, K.G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S., and Prives, C. (1997) *Genes Dev.*, 11, 558–570.
25. Walton, M., Lawlor, P., Sirimanne, E., Williams, C., Gluckman, P., and Dragunow, M. (1997) *Mol. Brain Res.*, 44, 167–170.
26. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997) *Nature*, 387, 296–299.
27. Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997) *Nature*, 387, 299–303.
28. Komarova, E.A., Zelnick, C.R., Chin, D., Zeremski, M., Gleiberman, A.S., Bacus, S.S., and Gudkov, A.V. (1997) *Cancer Res.*, 57, 5217–5220.
29. Aladjem, M.I., Spike, B.T., Rodewald, L.W., Hope, T.J., Klemm, M., Jaenisch, R., and Wahl, G.M. (1998) *Curr. Biol.*, 8, 145–155.
30. Moll, U.M., Ostermeyer, A.G., Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M., and Zambetti, G. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1126–1137.
31. Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., and Butel, J.S. (1992) *Nature*, 356, 215–221.
32. Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T., and Weinberg, R.A. (1994) *Curr. Biol.*, 4, 1–7.
33. Lee, J.M., Abrahamson, J.L.A., Kandel, R., Donehower, L.A., and Bernstein, A. (1994) *Oncogene*, 9, 3731–3736.
34. Livingstone, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T., and Tlsty, T.D. (1992) *Cell*, 70, 923–935.
35. Yin, Y., Tainsky, M.A., Bischoff, F.Z., Strong, L.C., and Wahl, G.M. (1992) *Cell*, 70, 937–948.
36. Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S.W. (1998) *Genes Dev.*, 12, 3008–3019.
37. De Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Lowe, S.W. (1998) *Genes Dev.*, 12, 2434–2442.
38. Jacks, T. (1996) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 122, 319–327.
39. Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veillette, C., and Riabowol, K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8348–8352.
40. Harley, C.B., and Sherwood, S.W. (1997) *Cancer Surv.*, 29, 263–284.
41. Yamaguchi, A., Kurosaka, Y., Fushida, S., Kanno, M., Yonemura, Y., Miwa, K., and Miyazaki, I. (1992) *Cancer*, 70, 2778–2784.
42. Pandrea, I.V., Mihailovici, M.S., Carasevici, E., Szekely, A.M., Reynes, M., Tarcoveanu, E., and Dragomir, C. (1995) *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*, 99, 171–178.
43. Iniesta, P., Vega, F.J., Caldes, T., Massa, M., de Juan, C., Cerdan, F.J., Sanchez, A., Lopez, J.A., Torres, A.J., Balibrea J.L., and Benito, M. (1998) *Cancer Lett.*, 130, 153–160.
44. Norberg, T., Jansson, T., Sjogren, S., Martensson, C., Andreasson, I., Fjallskog, M.L., Lindman, H., Nordgren, H., Lindgren, A., Holmberg, L., and Bergh, J. (1996) *Acta Oncol. Suppl.*, 5, 96–102.
45. Patel, D.D., Bhatavdekar, J.M., Chikhlikar, P.R., Ghosh, N., Suthar, T.P., Shah, N.G., Mehta, R.H., and Balar, D.B. (1996) *J. Surg. Oncol.*, 62, 86–92.
46. Fresno, M., Molina, R., Perez del Rio, M.J., Alvarez, S., Diaz-Iglesias, J.M., Garcia, I., and Herrero, A. (1997) *Eur. J. Cancer.*, 33, 1268–1274.
47. Falette, N., Paperin, M.P., Treilleux, I., Gratadour, A.C., Peloux, N., Mignotte, H., Tooke, N., Lofman, E., Inganas, M., Bremond, A., Ozturk, M., and Puisieux, A. (1998) *Cancer Res.*, 58, 1451–1455.
48. Molina, R., Segui, M.A., Climent, M.A., Bellmunt, J., Albanell, J., Fernandez, M., Filella, X., Jo, J., Gimenez, N., Iglesias, E., Miralles, M., Alonso, C., Peiro, G., Perez-Picanol, E., and Ballesta, A.M. (1998) *Anticancer Res.*, 18, 507–511.
49. Cordon-Cardo, C., Sheinfeld, J., and Dalbagni, G. (1997) *Semin. Surg. Oncol.*, 13, 319–327.
50. Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E., and Jacks, T. (1994) *Science*, 266, 807–810.
51. Deichman, G.J., Matveeva, V.A., Kashkina, L.M., Dyakova, N.A., Uvarova, E.N., Nikiforov, M.A., and Gudkov, A.V. (1998) *Int. J. Cancer*, 75, 277–283.
52. Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A., and Bouck, N. (1994) *Science*, 265, 1582–1584.
53. Adolph, K.W., Liska, D.J., and Bornstein, P. (1997) *Gene*, 193, 5–11.
54. Volpert, O.V., Tolsma, S.S., Pellerin, S., Feige, J.J., Chen, H., Mosher, D.F., and Bouck, N. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217, 326–332.
55. Komarova, E.A., Diatchenko, L., Rokhlin, O.W., Hill, J.E., Wang, Z.J., Krivokrysenko, V.I., Feinstein, E., and Gudkov, A. (1998) *Oncogene*, 17, 1089–1096.
56. Qazilbash, M.H., Xiao, X., Seth, P., Cowan, K.H., Walsh, C.E., Qazilbash, M.H., Xiao, X., Seth, P., Cowan, K.H., and Walsh, C.E. (1997) *Gene Ther.*, 4, 675–682.
57. Armstrong, J.F., Kaufman, M.H., Harrison, D.J., and Clarke, A.R. (1995) *Curr. Biol.*, 5, 931–936.
58. Sah, V.P., Attardi, L.D., Mulligan, G.J., Williams, B.O., Bronson, R.T., and Jacks, T. (1995) *Nat. Genet.*, 10, 175–180.
59. Pan, H., and Griep, A.E. (1995) *Genes Dev.*, 9, 2157–2169.
60. Almog, N., and Rotter, V. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, 1333, 1–27.
61. Shick, L., Carman, J.H., Choi, J.K., Somasundaram, K., Burrell, M., Hill, D.E., Zeng, Y.X., Wang, Y., Wiman, K.G., Salhany, K., Kadesch, T.R., Monroe, J.G., Donehower, L.A., and El-Deiry, W.S. (1997) *Cell Growth Differ.*, 8, 121–131.
62. Jiang, D., Lenardo, M.J., and Zuniga-Pflucker, C. (1996) *J. Exp. Med.*, 183, 1923–1928.



63. Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V., and Schwartz, M. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16, 5178–5185.
64. Schwartz, D., Goldfinger, N., and Rotter, V. (1993) *Oncogene*, 8, 1487–1494.
65. Hendry, J.H., Adeeko, A., Potten, C.S., and Morris, I.D. (1996) *Int. J. Radiat. Biol.*, 70, 677–682.
66. Wallingford, J.B., Seufert, D.W., Virta, V.C., and Vize, P.D. (1997) *Curr. Biol.*, 7, 747–757.
67. Komarova, E.A., Chernov, M.V., Franks, R., Wang, K., Armin, G., Zelnick, C.R., Chin, D.M., Bacus, S.S., Stark, G.R., and Gudkov, A.V. (1997) *EMBO J.*, 16, 1391–1400.
68. Gottlieb, E., Haffner, R., King, A., Asher, G., Gruss, P., Lonai, P., and Oren, M. (1997) *EMBO J.*, 16, 1381–1390.
69. MacCallum, D.E., Hupp, T.R., Midgley, C.A., Stuart, D., Campbell, S.J., Harper, A., Walsh, F.S., Wright, E.G., Balmain, A., Lane, D.P., and Hall, P.A. (1996) *Oncogene*, 13, 2575–2587.
70. Hall, E.J. (1994) *Radiology for the Radiologist*, J.B. Lippincott Company, 4 ed.
71. Kemp, C.J., Wheldon, T., and Balmain, A. (1994) *Nat. Genet.*, 8, 66–69.
72. Norimura, T., Nomoto, S., Katsuki, M., Gondo, Y., and Kondo, S. (1996) *Nat. Med.*, 2, 577–580.
73. Hall, P.A., and Lane, D.P. (1997) *Curr. Biol.*, 7, 144–147.
74. Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L., and Prives, C. (1996) *Genes Dev.*, 10, 2438–2451.
75. Lassus, P., Ferlin, M., Piette, J., and Hibner, U. (1996) *EMBO J.*, 15, 4566–4573.
76. Ronen, D., Schwartz, D., Teitz, Y., Goldfinger, N., and Rotter, V. (1996) *Cell Growth Differ.*, 7, 21–30.
77. Wilson, J.W., Pritchard, D.M., Hickman, J.A., and Potten, C.S. (1998) *Am. J. Pathol.*, 153, 899–909.
78. Rogel, A., Popliker, M., Webb, C.G., and Oren, M. (1985) *Mol. Cell. Biol.*, 5, 2851–2855.
79. Schmidt, P., Lorenz, A., Hameister, H., and Montenarh, M. (1991) *Development*, 113, 857–865.
80. Meritt, A.J., Potten, C.S., Kemp, C.J., Hickman, J.A., Balmain, A., Lane, D.P., and Hall, P.A. (1994) *Cancer Res.*, 54, 614–617.
81. Cui, Y.F., Zhou, P.K., Woolford, L.B., Lord, B.I., Hendry, J.H., and Wang, D.W. (1995) *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 14, 159–163.
82. Hasegawa, M., Zhang, Y., Niibe, H., Terry, N.H., and Meistrich, M.L. (1998) *Radiat. Res.*, 149, 263–270.
83. Merritt, A.J., Allen, T.D., Potten, C.S., and Hickman, J.A. (1997) *Oncogene*, 14, 2759–2766.
84. Hirabayashi, Y., Matsuda, M., Matsumura, T., Mitsui, H., Sasaki, H., Tukada, T., Aizawa, S., Yoshida, K., and Inoue, T. (1997) *Leukemia 11 Suppl.*, 3, 489–492.
85. Wlodarski, P., Wasik, M., Ratajczak, M.Z., Seignani, C., Hoser, G., Kawiak, J., Gewirtz, A.M., Calabretta, B., and Skorski, T. (1998) *Blood*, 91, 2998–3006.
86. Wang, L., Cui, Y., Lord, B.I., Roberts, S.A., Potten, C.S., Hendry, J.H., and Scott, D. (1996) *Radiat. Res.*, 146, 259–266.
87. Hendry, J.H., Cai, W.B., Roberts, S.A., and Potten, C.S. (1997) *Radiat. Res.*, 148, 254–259.
88. Tron, V.A., Trotter, M.J., Tang, L., Krajewska, M., Reed, J.C., Ho, V.C., and Li, G. (1998) *Am. J. Pathol.*, 153, 579–585.
89. Rotter, V., Schwartz, D., Almon, E., Goldfinger, N., Kapon, A., Meshorer, A., Donehower, L.A., and Levine, A.J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9075–9079.
90. Tada, M., Matsumoto, R., Iggo, R.D., Onimaru, R., Shirato, H., Sawamura, Y., and Shinohe, Y. (1998) *Cancer Res.*, 58, 1793–1797.
91. Bronchud, M. (1993) *Anticancer Drugs*, 4, 127–139.
92. Komarov, P.G., Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Christov-Tselkov, K., Coon, J.S., Chernov, M.V., and Gudkov, A. (1999) *Science*, 285, 1733–1737.

## SUPPRESSION OF p53 AS A NEW APPROACH TO REDUCE SIDE EFFECTS OF CANCER TREATMENT

E.A. Komarova, A.V. Gudkov

*Department of Molecular Genetics, University of Illinois at Chicago,  
900 South Ashland Ave., Chicago, IL 60607, USA;  
fax: (312)996-0683, E-mail: gudkov@uic.edu*

Submitted September 17, 1999

Translation of p53 studies into clinical applications has been traditionally viewed as an anti-cancer gene therapy aiming at restoration of the p53 function in tumors. However, p53 has another role in cancer treatments by determining high sensitivity of several normal tissues as a consequence of genotoxic stress associated with anti-tumor therapy. This makes p53 a potential target for therapeutic suppression with the purpose of rescuing normal tissues from the side effects of cancer treatment. Comparison of p53 wild type and p53-deficient mice indicates that p53 determines massive apoptosis occurring shortly after gamma irradiation in radiosensitive tissues and the sites of apoptosis match the tissue-specific pattern of p53 mRNA expression. In the hematopoietic system, and in different epithelia radiation-induced cell death strongly depends on p53, suggesting that p53 suppression would decrease damage and promote faster recovery of damaged tissues after anti-cancer therapy. To test this possibility, a small molecule was isolated for its ability to reversibly block p53-dependent transcriptional activation and apoptosis. This compound, pifithrin- $\alpha$ , protected mice from the lethal genotoxic stress associated with anticancer treatment without promoting the formation of tumors, suggesting that inhibitors of p53 may be useful drugs for reducing the side effects of cancer therapy and other types of stress associated with p53 induction.

**KEY WORDS:** p53, apoptosis, anti-tumor therapy.

## КИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА Src: СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

### Обзор

© 2000 г. А.Г. Татосян\*, О.А. Мизенина

*Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115478 Москва, Каширское ш., 24; факс: (095) 324-1205, электронная почта: tatosyan@space.ru*

Поступила в редакцию 17.09.99

Тирозинкиназы семейства Src вовлечены в различные пути передачи сигналов в клетке. Гены этой группы участвуют в таких важных процессах жизнедеятельности клетки, как рост, дифференцировка, адгезия, транскрипция генов и др. Белок Src при определенных изменениях в своей структуре приобретает онкогенный потенциал. В обзоре на примере прототипного представителя семейства – продукта гена Src и ряда родственных белков обобщены имеющиеся данные о структуре, субстратах, механизмах регуляции и роли в клетке нерецепторных тирозинкиназ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** онкогены, Src, тирозинкиназы, фосфорилирование, передача сигналов.

С точки зрения современной биологии гармоничное функционирование многоклеточного организма определяется способностью его клеток взаимодействовать между собой, а также их адекватной реакцией на изменение внешней среды. «Органами чувств» клетки являются поверхностные рецепторы, которые воспринимают внеклеточные факторы и соответствующим образом «информируют» клетку. Специфическое взаимодействие внешних факторов и мембранных рецепторов инициирует процесс передачи сигналов: «импульс», возникающий на клеточной мембране, усиливается и передается внутрь клетки по определенным сигнальным цепям. Некоторые из сигналов направляются в клеточное ядро и запускают экспрессию определенных генов. Ответ клетки на сигнальный стимул может иметь различные проявления: деление клетки (или, наоборот, остановка этого процесса), дифференциация, секреция гормонов и т.д.

В упрощенном виде механизм передачи сигналов в клетке представляет собой прямое взаимодействие специфических белков в строго определенной последовательности. Ряд ключевых белков может быть задействован в нескольких сигнальных путях. Основными участниками цепей передачи сигналов в клетках являются различные типы киназ, а также адапторные молекулы, которые не обладают ферментативной активностью. Фактически основными молекулярными принципами, на которых базируется механизм передачи сигналов в клетке, являются специфическая ассоциация белков и их фосфо-

рилирование (или дефосфорилирование). Фосфорилирование белков-мишеней ведет к мгновенному изменению их конфигурации и свойств. Баланс между фосфорилированием и дефосфорилированием определяет передачу внутриклеточных сигналов в норме. При малигнизации наблюдается обратная ситуация – сигнальная система перестраивается таким образом, чтобы обеспечить трансформированной клетке независимость от окружающей среды и тканей.

Системы передачи сигналов в клетке имеют очень сложную организацию и, несмотря на активные исследования, имеющаяся информация достаточно фрагментарна. В настоящее время наиболее подробно из белков, вовлеченных в процессы фосфорилирования и регулирующих клеточный рост и дифференцировку, исследованы тирозин-специфические протеинкиназы.

Тирозинкиназы катализируют перенос фосфата от АТФ на тирозиновый остаток специфических клеточных белков-мишеней. Основные категории тирозинкиназ делятся на две группы: рецепторные и нерецепторные.

Все рецепторные тирозинкиназы имеют сходное строение – состоят из лигандсвязывающего внеклеточного участка, гидрофобного трансмембранного домена и внутриклеточной (цитоплазматической) области. Последняя наряду с каталитическим тирозинкиназным доменом содержит регуляторные зоны. На данный момент существует 19 классов рецепторных тирозинкиназ, выделяемых на основе гомологии первичной структуры, структурных характеристик и аминокислотных мотивов цитоплазматического домена [1, 2].

\*Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

Нерецепторные тирозинкиназы – РТК (protein tyrosine kinase) являются промежуточными проводниками различных внутриклеточных сигнальных путей. Многие из этих киназ ассоциированы с трансмембранными рецепторами, например рецепторами гормонов, цитокинами, рецепторами факторов роста и др. Активация нерецепторных киназ происходит в результате ассоциации рецепторов с внеклеточными лигандами или компонентами клеточной адгезии, а также на определенных этапах клеточного цикла. На данный момент охарактеризовано восемь различных классов нерецепторных протеин-тирозиновых киназ, выделенных на основе структурных и функциональных сходств и варьирующих по молекулярной массе от 50 до 150 кДа [3, 4]. Классическим представителем тирозинкиназ нерецепторного типа является белок Src.

Протоонкоген *Src* выявлен в качестве первого гена, который потенциально способен индуцировать трансформацию клеток [5]. Мутантные варианты гена *Src* приводят к функциональной активации белкового продукта, в частности таким образом был образован ген *v-src* – онкоген вируса саркомы Рауса (RSV). Несмотря на то, что после открытия *v-src* были обнаружены многие онкогены, относящиеся к группе нерецепторных тирозинкиназ, *Src* остается в центре исследований в качестве прототипного онкобелка. Наиболее принципиальные данные о свойствах генов этого семейства получены именно при изучении гена *src* и кодируемого им белкового продукта.

Данный обзор посвящен анализу структурно-функциональных свойств киназ семейства *Src*, механизмов их регуляции и роли в клетке.

## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА *Src*

Члены семейства *Src* делятся на два класса: тирозинкиназы с обширным спектром экспрессии – *Fyn*, *Yes*, и с более ограниченным – *Fgr*, *Lyn*, *Hck*, *Lck*, *Blk*, *Yrc*. У позвоночных представители *Src* семейства имеют общую структуру [6].

Белки этой группы (молекулярная масса 52–62 кДа) состоят из шести различных функциональных областей (рис. 1): *Src*-гомологичный домен 4 (*Src* homology domain 4, SH4), уникальный домен, SH3-домен, SH2-домен, каталитический домен и С-терминальная регуляторная область.

SH4-домен представляет собой участок в 15–17 аминокислот, содержащий сигналы для модификации остатками жирных кислот [7]. Глицин в положении 2 миристилируется, при этом

обеспечивается связывание РТК с клеточными мембранами. Немиристилированные молекулы *Src* не связываются с мембраной. С другой стороны, некоторые молекулы *Src*-белка, несущие данную модификацию, могут находиться свободно в цитозоле. Вероятно, миристилирование не гарантирует ассоциацию белка с мембраной. В дополнение к сигналам миристилирования *Src* имеет основные аминокислотные остатки в составе SH4-домена, которые являются субстратами для посттрансляционного пальмитилирования. Пальмитилируются только миристилированные молекулы, а следовательно, этот процесс, вероятно, происходит на мембране. Пальмитилирование является обратимым процессом. Регулируемые депальмитилирование и репальмитилирование могут являться механизмами для изменения локализации киназ семейства *Src* в ответ на соответствующую стимуляцию [8, 9].

**Уникальный домен** (аминокислотные остатки 18–84) является специфичным для каждого белка семейства *Src*. Предполагается, что данная область отвечает за специфическое взаимодействие РТК с определенными рецепторами и белками-мишенями [10]. При этом *Src* является единственным представителем *Src* киназ, который фосфорилируется комплексом циклинзависимой киназы (*Cdc2*) с циклином В в М-фазе по Thr-34, Thr-46, и Ser-72 [11]. Эффект этого фосфорилирования неясен. Кроме того в уникальном домене имеются участки связывания протеинкиназы С (PKC) – остатки Ser-12 и Ser-48, которые фосфорилируются в клетках при активации PKC.

**SH3-домен** (аминокислотные остатки 85–140) необходим для взаимодействия с белками-субстратами, а также обеспечивает внутримолекулярные связи, регулирующие каталитическую активность, локализацию белка в клетке и ассоциацию с белками-мишенями [12]. SH3-домен *Src* представляет собой глобулярную структуру, одна сторона которой слабо гидрофобна и несет кластер кислых остатков. Этот домен связывается с пролин-богатыми участками субстратов РТК. Все известные лиганды SH3 несут консенсусную последовательность PXXP. Прилегающие к пролинам аминокислоты определяют специфичность индивидуальных SH3-доменов [13]. Лиганды SH3 могут связываться как в NH<sub>2</sub>-COOH-, так и в COOH-NH<sub>2</sub>-ориентации [14].

Последовательности SH3, так же как представленные ниже SH2 и каталитические домены, обнаружены в клеточных белках различных классов.

**SH2-домен** – второй модулирующий участок (аминокислотные остатки 141–260), который контролирует спектр белков, взаимодействующих с семейством *Src*. SH2-домены разных РТК узнают короткую аминокислотную последова-

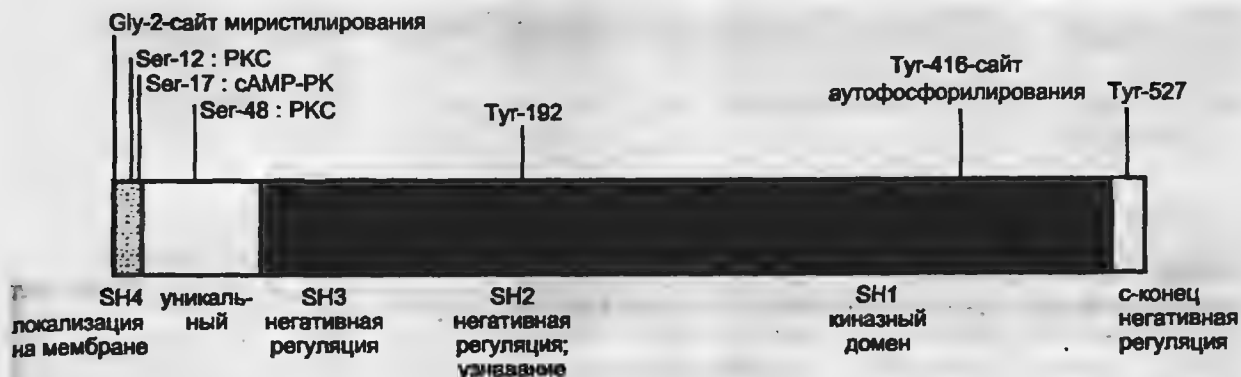


Рис. 1. Доменная структура белка Src

тельность, несущую фосфотирозин. Специфичность индивидуальных SH2-доменов определяется тремя-пятью остатками, следующими за тирозином [15]. В составе киназ семейства Src этот участок более консервативен, чем SH3-домен, и способен прочно связываться со специфическими белками, фосфорилированными по тирозину. SH2-домены Src и Lck киназ несут глубокие гидрофобные карманы для взаимодействия аминокислоты Ile в позиции  $\text{pY} + 3$ . Некоторые белки, взаимодействующие с Src, содержат оптимальную структуру для связывания —  $\text{pYEEI}$ . Однако не все белки, связывающиеся с SH2-доменом Src, имеют такую фосфорилированную последовательность.

Мутация в SH2-домене, затрагивающая участок аминокислотных остатков 142–169, приводит к трансформации клеток [16]. Возможно, эта мутация влияет на связывание Src с субстратами, в частности с белками цитоскелета (см. ниже).

Киназный домен (аминокислотные остатки 265–516) имеется у всех белков семейства Src, а также выявляется у других РТК. Он отвечает за тирозинкиназную активность и играет решающую роль в определении специфичности к субстратам [17]. Определенные остатки внутри этого домена идентичны у всех киназ и вовлечены в механизм связывания с АТФ и фосфотрансферную реакцию [18].

Аминокислотная последовательность, предпочтительно фосфорилируемая Src киназой, такова:  $\text{EEEI}\chi^G/\text{E} \text{EFD}$ . Киназы семейства Src могут связываться с некоторыми своими субстратами после фосфорилирования, способствуя фосфорилированию других последовательностей одной или нескольких находящихся рядом молекул субстрата [19]. Строгая специфичность к Tyr, а не к Ser или Thr, определяется близостью пептида, консервативной для всех тирозинкиназ

( $\text{FP}^{425}\text{IKWTA}$  в Src), к основной цепи субстрата. Остаток Pro способствует связыванию фенилаланилового кольца Tyr, но не может обеспечить связывание субстратов, несущих Ser или Thr.

Фосфорилирование по Tyr-416 способствует полной активации Src, а также обеспечивает участок связывания для SH2-доменов других клеточных белков. При удалении высококонсервативного для всех протеинтирозиновых киназ Leu-516, находящегося в каталитическом домене, происходит нарушение стабильности трансформирующей активности  $\text{p60 v-Src}$  [20].

**С-Концевой участок** (аминокислотные остатки 517–~536) играет важную роль в регуляции киназной активности Src. Все киназы Src-семейства несут С-концевой участок в 15–19 остатков, имеющий тирозин в постоянном положении и консервативном окружении (Tyr-527 у Src). Было показано, что удаление фосфотирозина из нормального Src увеличивало его киназную активность [21]. Фосфорилирование С-концевого Tyr ингибирует киназную активность более чем на 98% и подавляет любые стимулирующие воздействия, обусловленные фосфорилированием Tyr-416 каталитического домена [22].

**Различия в структуре белков v-Src и c-Src.** Основное различие между v-Src и c-Src наблюдается в структуре С-концов белков. «Хвостовые» 19 аминокислот c-Src белка включают остатки Tyr-527, выполняющего регуляторные функции, контролируя киназную активность [20, 23]. В v-Src эти 19 аминокислот заменены 12 аминокислотами, присутствующими во всех известных RSV-штаммах. Исключение составляет v-SrcLM, неканоническое строение которого ассоциируется со снижением метастатического потенциала трансформированных клеток [24]. Недавно было показано, что в метастазах рака

толстой кишки человека белок c-Src имеет нарушения в этой же области. Следует отметить, что на сегодняшний день это наиболее достоверный пример роли мутаций в гене *src* в канцерогенезе у человека [25].

### РЕГУЛЯЦИЯ Src-КИНАЗ

SH2- и SH3-домены играют ключевую роль в регуляции каталитической активности киназ семейства Src. Результаты рентгеноструктурного анализа позволили объяснить, как внутримолекулярные взаимодействия SH2 и SH3 стабилизируют неактивную конформационную структуру этих киназ. Оба этих домена прилегают к киназному домену с противоположной к каталитической щели стороны. SH3-домен взаимодействует с последовательностями в каталитическом домене и с последовательностями линкерной зоны, лежащей между SH2 и каталитическим доменами (рис. 2) [26]. SH2-домен взаимодействует с фосфотирозином 527, локализованным в С-терминальной области белка. Тир-527 в c-Src и соответствующие тирозины в других РТК являются участками первичного фосфорилирования *in vivo*. Это основание фосфорилируется цитоплазматической киназой Csk [27]. Утрата Тир-527 или его дефосфорилирование приводят к стимуляции каталитической активности Src. Этот вывод сделан на основании ряда экс-

периментальных данных: замена Тир-527 на другую аминокислоту конститутивно активизирует c-Src [28]; данный участок отсутствует в белке v-Src [29]; нарушение активности гена *csk* влечет за собой увеличение активности РТК семейства Src [30]. Таким образом предполагается, что фосфорилирование С-концевого тирозина под действием киназы Csk обуславливает внутримолекулярное взаимодействие этой области с SH2-доменом, что сохраняет белок Src в закрытой инактивированной форме.

Мутации в SH3-домене также приводят к активации Src-киназ, хотя роль SH3-домена в подавлении ферментативной активности белка неясна. Очевидно, что киназный домен остается доступным даже в «закрытой» конформационной структуре, т.е. когда SH2-домен ассоциирован с фосфотирозином 527 (рис. 2). SH3-домен образует независимый внутримолекулярный контакт с N-терминальным фрагментом киназного домена. Таким образом, инактивация киназы может быть результатом формирования жесткой структуры, образованной двойными связями SH2- и SH3-доменов с каталитической областью белка. Подобная структура препятствует движению внутри киназного домена. Мутации в любой из взаимодействующих областей белка Src нарушают жесткость структуры молекулы, что в свою очередь понижает стабильность других внутримолекулярных взаимодействий. Следовательно, как SH2-, так и SH3-домены

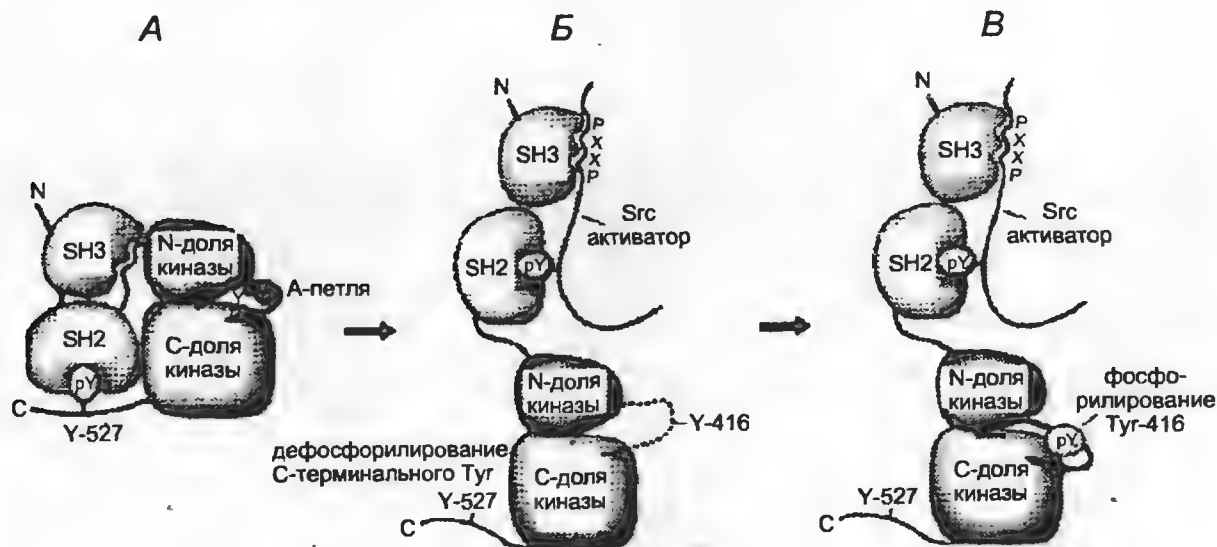


Рис. 2. А – закрытое, аутоингибированное состояние; Б – открытое промежуточное состояние, переход в которое происходит в результате взаимодействия SH3- и SH2-доменов с белковыми партнерами Src либо в результате дефосфорилирования С-концевого Тир-527. При этом Тир-416 становится доступным для фосфорилирования; В – открытая активная форма, в которой Тир-416 фосфорилирован



осуществляют регуляцию киназной активности путем внутримолекулярных контактов. Нарушение этих взаимодействий может быть основным механизмом активации Src белков. Не исключено, что эти домены играют аналогичную роль в регуляции киназной активности белков, не имеющих фосфотирозина в С-терминальной области (Fps, Abl) [31]. Следует отметить, что указанный механизм не только точно регулирует киназную активность белков Src, но и определяет взаимодействие SH2- и SH3-доменов с другими молекулами, что детерминирует различные уровни контроля белков семейства Src.

Как отмечалось выше, регуляция активности Src осуществляется по двум сайтам, воздействие на которые дает противоположные результаты. Фосфорилирование по Tyr-416 активационной петли киназного домена активирует фермент, а фосфорилирование С-концевого Tyr-527 делает фермент неактивным. Фактически различные регуляторные элементы, контролируемые активностью Src-белков, влияют лишь на несколько определенных участков киназного домена. Эти эффекторные элементы, содержат аминокислотные остатки, участвующие в катализе или в связывании с субстратами [32]. Ими могут быть активационная петля (аминокислотные остатки 404–432), каталитическая петля (зона аминокислоты 382) и С-спираль (зона аминокислоты 310). Изменение их положения и конформации фосфорилированием и взаимодействием с регуляторными субъединицами может осуществлять контроль над каталитической активностью.

*In vivo* Src-киназа может быть фосфорилирована лишь по одному из двух Tyr-остатков. Модель активации тирозинкиназы Src включает три последовательных этапа (рис. 2).

Активационная петля играет центральную роль в регулировании киназной активности. Ее фосфорилирование по Tyr-416 в Src (или соответствующих аминокислот в других тирозинкиназах) является необходимым условием полной активации большинства известных киназ. В отсутствие фосфорилирования активационная петля принимает различные, часто ингибирующие белок-белковые взаимодействия, конформации. Нефосфорилированная активационная петля может сама ингибировать киназную активность либо напрямую – нарушая участок, по которому происходит активация, либо косвенно – принимая конформацию, препятствующую связыванию с субстратами. Напротив, в фосфорилированном состоянии активационная петля принимает конформацию, одинаковую для всех изученных на сегодняшний день киназ. В такой активной конформации петля формирует часть участка узнавания субстратами [33].

## СУБСТРАТЫ Src

В настоящее время список белков, фосфорилированных по тирозину в результате функционирования гена *src*, достаточно велик. Он включает белки, непосредственно взаимодействующие и фосфорилированные Src, и белки, которые фосфорилированы по тирозину в *src*-трансформированных клетках, но для которых непосредственное взаимодействие с Src показано не было [34]. Некоторые белки из второй группы могут быть истинными белками-мишенями Src, хотя основная часть, по-видимому, является субстратами тирозинкиназ, которые были активированы белком Src в трансформированных клетках (таблица). Ниже представлены наиболее изученные белки-мишени действия Src.

**SHC.** Одним из основных субстратов, фосфорилированным в Src-трансформированных клетках или стимулированным факторами роста, является адапторный белок SHC, который содержит пролин-богатый участок и связывается с SH3-доменом белка Src *in vitro*. Этот белок играет ключевую роль в передаче сигнала от рецепторов интегринов к Ras-MAP пути передачи сигналов [35].

**p190.** Белок, который содержит GTPазный домен, фосфорилирован по тирозину в *src*-трансформированных и стимулированных факторами роста клетках [36]. Однако прямое взаимодействие белков p190 и Src выявлено не было. Фосфорилированный по тирозину p190 ассоциируется с комплексом Ras-GAP через SH2-домен последнего.

**PI3-киназа** вовлечена в передачу сигнала от рецептора факторов роста (см. статью М. Красильникова в настоящем номере журнала). Этот белок ассоциирован с белками семейства Src в трансформированных фибробластах или в активированных В- и Т-клетках [37, 38]. Прямое физическое взаимодействие между р85-субъединицей PI3K с SH3-доменами различных белков семейства Src было показано в ряде работ [39, 40].

Второй класс субстратов Src включает белки, которые не являются субстратами рецепторов тирозинкиназ. Эти белки-мишени отражают множественные связи и функции белков семейства Src и включают белки, вовлеченные в организацию цитоскелета, клеточную адгезию, межклеточные контакты и процессинг РНК. К подобным субстратам относятся белок, ассоциированный с актиновым филаментом p110 (AFAP 110), кортактин, FAK, паксиллин, тензин, таллин, винкулин и p130 CAS (cadherin-associated src substrate).

**AFAP110 и кортактин.** В *src*-трансформированных клетках AFAP110 и кортактин гиперфос-

## Белки-мишени Src-киназы

| Белок-мишень               | Функция                                                                                                                                                                 | Домен Src, отвечающий за связывание |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| p85-Субъединица P13-Киназы | некаталитическая субъединица P13-киназы                                                                                                                                 | SH3, SH2                            |
| RasGAP                     | GTPазный активатор Ras                                                                                                                                                  |                                     |
| SHPTP2/Syp                 | фосфотирозинфосфатаза                                                                                                                                                   |                                     |
| Shc                        | связывает Grb2 – адапторный белок, участвующий в транслокации факторов нуклеотидного обмена (GEF) к мембране, где находится Ras, способствуя активации сигнального пути |                                     |
| PLC $\gamma$               | P1-специфичная фосфолипаза C                                                                                                                                            |                                     |
| p62                        | RasGAP-ассоциированный белок                                                                                                                                            |                                     |
| p190                       | GTPазный активатор Rho                                                                                                                                                  |                                     |
| Тензин                     | связывание с актином, интегриновая система передачи сигналов                                                                                                            |                                     |
| Винкулин                   | связывание с актином, интегриновая система передачи сигналов                                                                                                            |                                     |
| Кортактин                  | связывание с кортикальным актином                                                                                                                                       | SH2                                 |
| Талин                      | связывание с актином и интегрином, интегриновая система передачи сигналов                                                                                               |                                     |
| Паксиллин                  | интегриновая система передачи сигналов                                                                                                                                  |                                     |
| AFAP110                    | ассоциирован с актиновыми филаментами                                                                                                                                   | SH3, SH2                            |
| ФАК                        | тирозинкиназа, связывание с интегрином и интегриновая система передачи сигналов                                                                                         | SH2                                 |
| $\beta$ 1-Интегрин         | образование адгезионных соединений и система передачи сигналов                                                                                                          | SH2                                 |
| p130 <sup>CAS</sup>        | интегриновая система передачи сигналов                                                                                                                                  |                                     |
| p120 <sup>CAS</sup>        | катенин, клеточная адгезия                                                                                                                                              |                                     |
| $\beta$ -Катенин           | связывание с интегрином, межклеточная адгезия                                                                                                                           | SH2, SH3                            |
| $\gamma$ -Катенин          | клеточная адгезия                                                                                                                                                       |                                     |
| Sam68                      | связывание с РНК                                                                                                                                                        |                                     |
| Калпактин I – аннексин II  | связывание Ca <sup>2+</sup> -фосфолипидов                                                                                                                               |                                     |

фосфорилированы по тирозину [41–43]. Взаимодействие Src с AFAP110 осуществляется за счет ассоциации с SH2- и SH3-доменами, а кортактин связывается только за счет SH2-домена. В фибробластах с подавленной киназой Csk кортактин гиперфосфорилирован по тирозину, что объясняется повышенной активностью Src в этих клетках [44].

**ФАК и паксиллин.** Эти белки становятся гиперфосфорилированными в *src*-трансформиро-

ванных клетках. Однозначно объяснить этот факт пока трудно, так как активация интегринов приводит к фосфорилированию белков фокальной адгезии и усилению взаимодействия клеток с субстратом, в то время, как в *src*-трансформированных клетках на фоне фосфорилирования тех же белков число фокальных контактов понижено, а структура изменена. Взаимодействие между Src и ФАК достаточно сложное. ФАК аутофосфорилируется под действием интегринов, в ре-

зультате чего тирозин в положении 397 становится доступен для SH2-домена Src [45]. Соответственно стимулируется киназная активность Src и происходит обратное фосфорилирование FAK по четырем тирозиновым остаткам, что приводит к индукции его полноценной активности. Другие потенциальные субстраты Src в зоне фокальных контактов могут быть также и субстратами для FAK. Этот вопрос остается открытым, так как дискриминировать субстратную специфичность двух киназ, находящихся в комплексе, трудно. Например, паксиллин, ассоциируясь с С-концевым фрагментом FAK, может взаимодействовать с Src за счет SH3-домена [46]. Имеются доказательства, что FAK не единственный фермент, способный фосфорилировать паксиллин, винкулин, таллин и тензин, так как было продемонстрировано, что в дефектных по FAK клетках мышей указанные белки остаются в фосфорилированном состоянии [47].

**p120 CAS.** Проявлением активности Src в зоне межклеточных контактов является увеличенный уровень фосфорилирования по тирозину p120 CAS в клетках, трансформированных геном *src* [48].

**Sam68** относится к недавно выявленному новому классу субстратов Src – РНК-связывающим белкам. Этот белок ассоциируется с Src за счет пролин-богатого участка и SH3-домена и избирательно фосфорилируется во время митоза [49, 50]. Значение фосфорилирования Sam68 или его ассоциация с Src остаются не ясны, хотя имеются предположения, что Src участвует в регуляции процессинга про-мРНК [50].

С помощью метода двойных гибридов – техники, позволяющей идентифицировать гены, кодирующие потенциально взаимодействующие белки, недавно был выявлен ряд белков и пептидов, способных ассоциироваться с белком Src [51, 52].

**mDab1** в фосфорилированном по Тут состоянии обнаруживается в комплексе с Src-белком и активно продуцируется в нервных клетках в процессе развития этой ткани. Предполагается, что mDab1 является адапторным белком определенной цепи передачи сигнала, функционирующей при формировании сети нейронов [51].

### РОЛЬ Src В РЕГУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ

За последние годы накопился значительный объем информации об участии гена *src*, а также некоторых других представителей тирозинкиназ в различных клеточных процессах. Ниже представлены обобщенные данные, отражающие биологические функции Src-белка.

**Транскрипция генов.** На модели фибробластов, трансформированных *v-Src*, была показана позитивная или негативная регуляция транскрипции ряда клеточных генов [53–55]. Стимулирующее действие *v-Src* описано при анализе многих факторов регуляции транскрипции, включающих NF- $\kappa$ B, ATF/CRE, AP1 [56–58]. Наиболее показательным примером регуляции транскрипции белком с-Src является контроль экспрессии Мус под действием рецептора PDGF (см. ниже).

Конститутивная киназная активность *v-Src* в опухолевых клетках запускает киназные каскады, регулирующие транскрипцию, например MAPK-каскад [59–61].

Существуют данные, свидетельствующие что члены семейства STAT (signal transducers and activators of transcription)-молекул, передающих сигналы внутри клетки в ответ на стимуляцию цитокинами, являются транскрипционными факторами, вовлеченными в онкогенез. Эти белки (в частности, STAT3) проявляют конститутивный возросший уровень фосфорилирования по тирозину и усиление ДНК-связывающей активности в фибробластах, трансформированных *v-Src*. STAT-гены активируются при запуске нескольких клеточных сигнальных каскадов, в частности с участием JAK-белков, также конститутивно активированных в клетках, трансформированных *Src* [62]. В опухолевых клетках многие белки STAT-семейства конститутивно активированы, например в клетках карциномы молочной железы, лимфомах, лейкозах и др. [63–66].

Для проникновения в кровеносные сосуды инвазивная клетка, обладающая метастатическим потенциалом, должна разрушить внеклеточный матрикс. В клетках, трансформированных *v-Src*, эту функцию выполняет коллагеназа-1 – металлопротеиназа матрикса-1 (MMP-1), транскрипция которой активируется в ответ на воздействие элементов сигнального каскада, индуцированного действием *v-Src* через ERK сигнальный каскад [67, 68]. Факторами транскрипции, контролирующими экспрессию, являются STAT, так как в промоторной области MMP-1 существуют STAT-связывающие участки [68].

**Адгезия.** Фибробласты с подавленным геном *Src* (*Src*<sup>-/-</sup>) имеют сниженный уровень адгезии при росте на подложке фибронектина. Предполагается, что ген *Src* необходим для оптимизации эффективности адгезии, но не обязателен для запуска этого процесса. Фибробласты с «отключенным» геном *Src* не отличимы от клеток, экспрессирующих этот белок на коллагеном матриксе, т.е. *Src*, вероятно, функционирует в сигнальной системе, индуцируемой фибронектином. Механизм регуляции адгезии под дейст-

вием Src в настоящее время не изучен. Однако известно, что каталитическая активность этого белка не обязательна, а интактность SH2- и SH3-доменов необходима для осуществления данного процесса. По-видимому, Src функционирует в качестве адапторного белка, локализуя специфические белки в адгезионных структурах [69].

Фосфорилирование тирозина наблюдается при формировании фокальной адгезии, так как подавление РТК блокирует данное событие. Какой именно из представителей семейства Src играет решающую роль в данном процессе, неясно, так как известно несколько белков этой группы, ассоциированных с адгезионными структурами (Src, Fyn, Abl и др.) [70, 71]. Важнейшую роль для осуществления фосфорилирования структур фокальной адгезии играет взаимодействие белков через SH2-связывающие участки.

Компоненты фокальной адгезии вовлечены в процесс передачи сигналов, индуцированной интегринами. Ключевой для стимуляции этой сигнальной цепи является киназа фокальных контактов FAK. Этот фермент ассоциируется и/или фосфорилируется с комплексом различных белков, включающим паксин, белки семейства Src, адапторы, «обменный» фактор Sos (см. ниже) и др. Естественно, что важным фактором передачи сигнала в данной системе также являются фосфорилирование и дефосфорилирование белков-мишеней. Src связывается и фосфорилирует FAK, таким образом участвуя в регуляции FAK-специфической киназной активности [72, 73].

Структуры, похожие на комплексы фокальной адгезии, формируются интегринами в других типах клеток. Например, Src, Yes, таллин, винкулин и другие белки ассоциируются с крупными нерастворимыми комплексами, вовлеченными в агрегацию тромбоцитов [74].

**Миграция.** Различные сигнальные молекулы способны влиять на миграцию клеток, действуя на клеточную адгезию и перестройку цитоскелета. Исследования на различных экспериментальных системах показали, что Src вовлечен в механизмы, обеспечивающие миграцию клеток [75]. Фибробласты мышей с «нокаутированным» геном *Src* (*Src-l-*) имеют низкий уровень подвижности по сравнению с диким типом этих клеток. Наблюдаемый дефект компенсируется после введения активного с-Src [76]. с-Src вовлечен в процесс миграции клеток карциномы крыс, индуцированный эпидермальным фактором роста [77, 78].

Белок Src может действовать на миграцию клеток на различных этапах сигнальной системы: воздействуя на интегринзависимую адгезию, на перестройку актинового цитоскелета, на изме-

нение экспрессии генов, контролирующих экспрессию интегринов, а также на последующие молекулы в системе передачи сигналов. Недавно была продемонстрирована роль MAPK-каскада (mitogen-activated protein kinases) в миграции клеток, индуцированной интегринами. Известно, что Src активирует MAP-киназный путь передачи сигналов, поэтому не исключено, что роль белков этого семейства в миграции клеток частично сводится к активации MAP-киназ [79, 80]. Другие белки, вовлеченные в процессы миграции клеток (например, FAK и фосфоинозитолкиназа-3, PI3K), являются субстратами Src, что не исключает влияния Src на подвижность клеток через киназы других групп.

**Клеточный цикл.** Киназы семейства Src вовлечены в индукцию синтеза ДНК под действием различных тирозиновых рецепторов факторов роста. Микроинъекция ДНК инактивированной формы Src или антител, взаимодействующих с С-концевой областью белка Src, ингибируют синтез ДНК под действием эпителиального фактора роста (EGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и колониестимулирующего фактора (CSF1). Экспрессия Src с инактивированным киназным доменом в фибробластах *src-l-* блокирует индуцированный PDGF синтез ДНК [81]. Стимуляция протоонкогена Мус под действием PDGF блокируется антителами к Src, но синтез ДНК может быть восстановлен в результате экспрессии экзогенного Мус. В то же время синтез ДНК, индуцированный бомбезином, не зависит от Src [82]. В последнее время появились сообщения, что роль белков семейства Src в PDGF-индуцированном пути передачи сигнала не столь однозначна: в клетках мышей с дефектными генами Src, Yes и Fyn успешно осуществляется прохождение сигнала от рецептора данного фактора роста [83].

Другие рецепторы также могут использовать Src-киназу для стимуляции различных клеточных путей, вовлеченных в индукцию синтеза ДНК. Например, v-Src активирует MAP-киназный каскад и PI3K-сигнальные молекулы, участвующие в пролиферации клеток. Таким образом, Src вовлечен в пути передачи сигналов, которые индуцируются различными рецепторами, и стимулирует синтез ДНК, используя различные механизмы.

Белок Src включен в регуляцию перехода G2/М. Доказательством значительной роли с-Src в митозе соматических клеток явились данные анализа этого белка в клетках, заблокированных на стадии митоза в результате воздействия Src-специфических антител [84]. Активность Src значительно возрастает в заблокированных в метафазе клетках, причем стимуляция киназы

коррелирует с фосфорилированием белка Src по серин-треониновым остаткам в уникальном домене белка. Это фосфорилирование осуществляется киназой CDC2. Деление фибробластов мышей блокируется инъекцией Src-специфических антител на стадии G2, т.е. функционирование этого белка необходимо для перехода от G2-стадии к клеточному делению. Следует отметить, что помимо Src в делении клеток принимают участие и другие белки этого семейства (Fyn и Yes). Ингибирующее влияние на клеточное деление оказывают лишь антитела, перекрестно взаимодействующие с C-концевым пептидом всех указанных белков. Субстратом Src в процессе митоза является белок Sam68, который ассоциируется с Src через SH3- и SH2-домены [85]. Src-киназы могут быть также вовлечены в Ras-MAP-киназные пути передачи сигналов в процессе митоза, что подтверждается фактом активации белка Raf (эффектора Ras в сигнальной цепи) при клеточном делении [86].

**Апоптоз.** Экспрессия v-Src препятствует переходу некоторых типов клеток в апоптоз, индуцированный элиминацией цитокинов, облучением или разрушением клеточных контактов с экстрацеллюлярным матриксом [87–89]. Другими словами, активация Src подавляет эффективность цитокиновых рецепторов, интегринов и другие рецепторные пути передачи сигналов, что защищает клетку от реализации различных программ апоптоза. Роль Src-киназ в ряде данных процессов может быть не прямой, т.е. они способны запускать инициирующие события, которые в свою очередь «включают» компоненты последующих этапов сигнального пути.

**Дифференцировка.** В зрелых клетках экспрессия v-Src приводит к драматическим изменениям в программе дифференцировки: в большинстве типов клеток этот процесс полностью блокируется. Например, инфекция вирусом саркомы Рауса миелобластов, ретинобластов или хондробластов сохраняет эти клетки в пролиферативном состоянии и останавливает их последующую дифференцировку [90, 91]. Напротив, введение v-Src в клетки PC12 или незрелые симпатические нейроны индуцирует рост и терминальную дифференцировку в нейрон-подобные клетки [92, 93]. Следует подчеркнуть, что отмеченные эффекты v-Src на дифференцировку не означают, что клеточные аналоги этого гена производят подобные действия в норме. Не исключено, что высокоактивный v-Src «нейтрализует» нормальные свойства клеточных тирозинкиназ, фосфорилируя общие белки-мишени. Такая картина наблюдается при сравнении действия v-Src и фактора роста нейронов (NGF). В клетках PC12 изменения, индуцированные v-Src,

перекрывают действие NGF, включая фосфорилирование клеточных белков, транскрипцию генов и пр. [94]. С другой стороны, известно, что c-Src является одним из компонентов для реализации активности NGF, так как микроинъекция моноклональных антител к c-Src блокирует NGF-индуцированный процесс роста. Влияет ли активированный Src на остановку дифференцировки незрелых клеток в результате стимуляции клеточной пролиферации или вследствие нарушения транскрипции генов, регулирующих этот процесс, остается неясным.

«Нокаут» мышей по гену *Src* приводит к развитию у них остеопороза [95], что доказывает необходимость Src для нормальной дифференцировки и сигнализации в остеокластах. Является ли нарушение функционирования таких клеток следствием разрегулирования позднего этапа дифференцировки или неспособности остеокластов реагировать на внеклеточные сигналы, неизвестно. Конечный же результат – это пониженная резорпция кости, что приводит к ее разрастанию.

Из представленного материала следует, что киназы семейства Src играют значительную роль в регуляции важнейших процессов в клетках. Специфическое взаимодействие этих белков с субстратами определяет нормальное и последовательное распределение регулирующих сигналов в клетке. Следовательно, трансформирующее действие v-Src может быть опосредовано разрегулированием митогенных сигнальных каскадов, в норме стимулирующихся факторами роста. Есть все основания полагать, что v-Src трансформирует фибробласты в результате неконтролируемого выполнения им функций нормального клеточного Src-белка, а не в результате фосфорилирования нехарактерных для него субстратов. Как следствие, v-Src не может трансформировать те типы клеток, для которых подобные изменения цитоскелета попадают в пределы нормы [6].

Поражает, как сигналы, стимулирующие ограниченное число Src-киназ, контролируют различные события в клетке. Другими словами, как происходит функциональное перераспределение сигналов, исходящих от различных рецепторов и проходящих через одни и те же звенья цепи передачи сигналов. Эта загадка относится и к другим компонентам сигнальных цепей, например белкам семейства Ras, PI3K, PKC и др., которые активируются широким спектром рецепторов и вовлечены во многие внутриклеточные процессы. Ответы на эти вопросы в настоящее время являются ключевыми в молекулярной онкологии.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilks, A.F. (1993) *Adv. Cancer Res.*, **60**, 43–73.
2. Shawver, L.K., Strawn, L.M., and Ulrich, A. (1995) *Mutat. Res.*, **333**, 23–28.
3. Taniguchi, T. (1995) *Science*, **268**, 251–255.
4. Bolen, J.B. (1993) *Oncogene*, **8**, 2025–2031.
5. Jove, R., and Hanafusa, H. (1987) *Ann. Rev. Cell Biol.*, **3**, 31–56.
6. Brown, M.T., and Cooper, J.A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1287**, 121–149.
7. Rech, M.D. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1155**, 307–322.
8. Kaplan, J.M., Mardon, G., Bishop, J.M., and Varmus, H.E. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2435–2441.
9. Pellman, D., Garber, E.A., Cross, F.R., and Hanafusa, H. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1623–1627.
10. Thomas, S.M., and Brugge, J.S. (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **1287**, 121–149.
11. Superti-Furga, G., and Courtneidge, S.A. (1995) *BioEssays*, **17**, 321–330.
12. Pawson, T. (1995) *Nature*, **373**, 573–580.
13. Riskles, R.J., Botfield, M.C., Zhou, X.M., Henry, P.A., Brugge, J.S., and Zoller, M.J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10909–10913.
14. Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgamo, D.C., Brauer, A.W., and Schreiber, S.L. (1994) *Cell*, **76**, 933–945.
15. Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnoffsky, S., and Lechleider, R.J. (1993) *Cell*, **72**, 767–778.
16. Raymond, V.M., and Parsons, J.T. (1987) *Virology*, **160**, 400–410.
17. Hesketh, R. (1995) *The Oncogene Handbook. Acad. Press, London*.
18. Hughes, A. (1996) *J. Mol. Evol.*, **42**, 247–256.
19. Mayer, B.J., Hirai, H., and Sakai, R. (1995) *Curr. Biol.*, **5**, 296–305.
20. Yaciuk, P., and Shalloway, D. (1986) *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 20807–20829.
21. Schwartzberg, P.L. (1998) *Oncogene*, **17**, 1463–1468.
22. Van Hoek, M.L., Allen, C.S., and Parsons, C.J. (1997) *Biochem. J.*, **326**, 271–277.
23. Dorai, T., Levy, J.B., Kang, L., Brugge, J.S., and Wang, L.H. (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4165–4176.
24. Tatosyan, A., Yatsula, B., Shtutman, M., Moinova, E., Kaverina, I., Musatkina, E., Leskov, K., Mizzenina, O., Zueva, E., Calothy, G., and Dezelee, P. (1996) *Virology*, **216**, 347–356.
25. Irby, R.B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J.M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D.J., Jove, R., and Yeatman, T.J. (1999) *Nature Genet.*, **21**, 187–190.
26. Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Erc, M.J., and Harrison, S.C. (1999) *Mol. Cell*, **3**, 629–638.
27. Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J.A., and Nakagawa, H. (1991) *Nature*, **351**, 69–72.
28. Kmiecik, T.E., and Shalloway, D. (1987) *Cell*, **49**, 65–73.
29. Reynolds, A.B., Vila, J., Lansing, T.J., Potts, W.M., Weber, M.J., and Parsons, J.T. (1987) *EMBO J.*, **6**, 2359–2364.
30. Imamoto, J., and Soriano, P. (1993) *Cell*, **73**, 1117–1124.
31. Pawson, T., and Gish, G.D. (1992) *Cell*, **71**, 359–362.
32. Sichei, F., Moarefi, I., and Kuriyan, J. (1997) *Nature*, **385**, 602–609.
33. Xu, W., Harrison, S.C., and Eck, M.J. (1997) *Nature*, **385**, 595–602.
34. Schaller, M.D., Bouton, A.H., Flynn, D.C., and Parsons, J.T. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **44**, 205–227.
35. Ellis, C., Moran, M., McCormick, F., and Pawson, T. (1990) *Nature*, **343**, 377–381.
36. Settelman, J., Narasimhan, V., Foster, L.C., and Weinberg, R.A. (1992) *Cell*, **69**, 539–549.
37. Cambier, J.C., Pleiman, C.M., and Clark, M.R. (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 457–486.
38. Fukui, Y., and Hanafusa, H. (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1972–1979.
39. Liu, X., Marengere, L.E.M., Koch, A., and Pawson, T. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5225–5232.
40. Petch, L.A., Bockholt, S.M., Bouton, A., Parsons, J.T., and Burridge, K. (1995) *J. Cell Sci.*, **108**, 1371–1379.
41. Reynolds, A.B., Kanner, H.C., Wang, R., and Parsons, J.T. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3951–3958.
42. Kanner, S.B., Reynolds, A.B., Wang, H.C., Vines, R.R., and Parsons, J.T. (1991) *EMBO J.*, **10**, 1689–1698.
43. Wu, H., and Parsons, J.T. (1993) *J. Cell Biol.*, **120**, 1417–1426.
44. Thomas, S.M., Soriano, P., and Imamoto, A. (1995) *Nature*, **376**, 267–271.
45. Cobb, B.S., Schaller, M.D., Leu, T., and Parsons, J.T. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 147–155.
46. Hildebrand, J., Schaller, M., and Parsons, J.T. (1993) *J. Cell Biol.*, **123**, 993–1005.
47. Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995) *Nature*, **377**, 539–544.
48. Reynolds, A.B., Herbert, L., Cleveland, J.L., Berg, S.T., and Gaut, J.R. (1992) *Oncogene*, **7**, 2439–2445.
49. Fumagalli, S., Totty, N.F., Hsuan, J.J., and Courtneidge, S.A. (1994) *Nature*, **368**, 871–874.
50. Neel, H., Gondran, P., Weil, D., and Dautry, F. (1995) *Curr. Biol.*, **5**, 413–422.
51. Howell, B.W., Gertley, F.B., and Cooper, J.A. (1997) *EMBO J.*, **16**, 121–132.
52. Mizzenina, O., Yanushevitch, U., Musatkina, E., Rodina, A., Camonis, J., Tavitian, A., and Tatosyan, A. (1998) *FEBS Lett.*, **422**, 79–84.
53. Bedard, P.A., Yammoni, Y., Simmons, D.L., and Erikson, R.L. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1371–1375.
54. Qureshi, S.A., Rim, M.H., Alexandropoulos, K., Berg, K., Sukhatme, V.P., and Foster, D.A. (1992) *J. Exp. Med.*, **183**, 407–414.
55. Scholz, G., Martinier, C., and Perbal, B. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 481–486.
56. Xie, W., Fletcher, B.S., Andersen, R.D., and Hershman, H.R. (1994) *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6531–6539.
57. Wasylyk, C., Immler, J.L., and Wasylyk, B. (1993) *Cell*, **72**, 767–778.
58. Cao X., Tay A., Guy, G.R., and Tan, Y.H. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1595–1603.
59. Aftab, D.T., Kwan, J., and Martin, G.S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3028–3033.
60. Meng, F., and Lowell, C.A. (1998) *EMBO J.*, **17**, 4391–4403.
61. Gupta, S.K., Gallego, C., Johnson, G.L., and Haesley, L.E. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 7087–7990.
62. Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P., and Jove, R. (1998) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 2545–2552.
63. Rech, M.D. (1994) *Cell*, **76**, 411–414.
64. Weber-Nordt, R.M., Egen, C., Wehinger, J., Ludwig, W., Gouilleux-Gruart, V., Mertelsmann, R., and Finke, J. (1996) *Blood*, **88**, 809–816.
65. Stankovski, H., Gonen, A., Orian, A.L., Schwartz, A., and Ceichanover, A. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 7106–7116.
66. Garcia, R., Yu, C.L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K.L., Smithgall, T., Fujita, D.J., Ethier, S.P., and Jove, R. (1997) *Cell Growth Differ.*, **8**, 1267–1276.

67. Hansell, E.J., Frisch, S.M., Tremble, P., Murnane, J.P., and Werb, Z. (1995) *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 373–389.
68. Vincenti, M.P., Schroen, D.J., Coon, C.I., and Brinckerhoff, C.E. (1998) *Mol. Carcinogenesis*, **21**, 194–204.
69. Kaplan, K.B., Swedlow, J.R., Morgan, D.O., and Varmus, H.E. (1995) *Genes Dev.*, **9**, 1505–1517.
70. Romer, L.H., Burridge, K., and Turner, C.E. (1992) *Quart. Biol.*, **57**, 193–202.
71. Ridley, A.J., and Hall, A. (1994) *EMBO J.*, **13**, 2600–2610.
72. Calalb, M.B., Polte, T.R., and Hanks, S.K. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 954–963.
73. Schlaepfer, D.D., and Hanter, T. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5623–5633.
74. Fox, J.E., Lipfert, L., Clark, E.A., Reynolds, C.C., Austin, C.D., and Brugge, J.S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 25973–25984.
75. Altun-Gultekin, Z.F., and Wagner, J.A. (1996) *J. Neurosci. Res.*, **44**, 308–327.
76. Hall, C.L., Lange, L.A., Prober, D.A., Zhang, S., and Turley, E.A. (1996) *Oncogene*, **13**, 10.
77. Rodier, J.M., Valles, A.M., Denoyelle, M., Thiery, J.P., and Boyer, B. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 761–773.
78. Bell, G.M., Bolen, J.B., and Imboden, J.B. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5548–5554.
79. Schlaepfer, D.D., Broome, M.A., and Hunter, T. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1702–1713.
80. Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., De Lanerolle, P., and Cheresch, D.A. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4541–4546.
81. Broome, M.A., and Hunter, T. (1997) *Oncogene*, **14**, 17–34.
82. Barone, M.V., and Courtneidge, S.A. (1995) *Nature*, **378**, 509–512.
83. Klinghofer, R.A., Sachsenmaier, C., Cooper, J.A., and Soriano, P. (1999) *EMBO J.*, **18**, 2459–2471.
84. Tailor, S.J., and Shalloway, D. (1996) *BioEssays*, **18**, 9–11.
85. Weng, Z., Thomas, S.M., Rickles, R.J., Taylor, J.A., Brauer, A.W., Seidel-Dugan, C., Michael, W.M., Dreyfuss, G., and Brugge, J.S. (1994) *Mol. Cell Biol.*, **14**, 4509–4521.
86. Pathan, N.I., Ashendel, C.L., Geahlen, R.L., and Harrison, M.L. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 30315–30317.
87. McCubrey, J.A., Smith, S.R., Algate, P.A., DeVente, J.E., White, M.K., and Steelman, L.S. (1993) *Oncogene*, **8**, 2905–2915.
88. Frisch, S.M., and Francis, H. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 619–626.
89. Basu, A., and Cline, J.S. (1995) *Int. J. Cancer*, **63**, 597–603.
90. Yoshimura, M., Iwasaki, Y., and Kaji, A. (1981) *J. Cell. Physiol.*, **109**, 373–385.
91. Alema, S., and Tato, F. (1987) *Adv. Cancer Res.*, **49**, 1–28.
92. Haltmeier, H., and Rohrer, H. (1990) *J. Cell Biol.*, **110**, 2087–2098.
93. Hecker, G., Lewis, D.L., Rausch, D.M., and Jelsema, C.L. (1991) *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 385–386.
94. Thomas, S.M., Hayes, M., D'Arcangelo, G., Armstrong, R.C., Meyer, B.E., Zilberstein, A., Brugge, J.S., and Halegoua, S. (1991) *Mol. Cell Biol.*, **11**, 4739–4750.
95. Thomas, S.M., Hayes, M., D'Arcangelo, G., Armstrong, R.C., Meyer, B.E., Zilberstein, A., Brugge, J.S., and Halegoua, S. (1991) *Mol. Cell Biol.*, **11**, 4739–4750.
96. Soriano, P., Muller, O., Clark, R., Conroy, L., Moran, M.F., Polakis, P., and McCormick, F. (1992) *Cell*, **69**, 551–558.

## THE Src FAMILY TYROSINE KINASES: STRUCTURE AND FUNCTIONS

A.G. Tatosyan, O.A. Mizenina

*Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,  
Russian Academy of Medical Sciences,  
Kashirskoye sh. 24, Moscow, 115478; fax: (095) 324-1205,  
E-mail: tatosyan@space.ru*

Submitted September 17, 1999

The Src family tyrosine kinases are involved in different signal transduction pathways in cell. Genes of this group participate in such important cell processes as growth, differentiation, adhesion, genes transcription and others. Src protein under certain changes in its structure acquires oncogenic potentiation. This review summarizes the data about structure, substrates, regulation mechanisms and functions of non-receptor tyrosine kinases in cell using *src* gene as a prototype of Src family and some relative proteins as example.

**KEY WORDS:** oncogenes, Src, tyrosine kinases, phosphorylation, signal transduction.

УДК 576.385.5

## СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, РЕГУЛИРУЕМЫЕ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТ-3-КИНАЗОЙ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ РОСТА, ВЫЖИВАЕМОСТИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК

### Обзор

© 2000 г. М.А. Красильников

*Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115478 Москва, Каширское ш., 24; факс: (095) 324-1205,  
электронная почта: mkras@mail.cnr.ru*

Поступила в редакцию 17.09.99

На сегодняшний день фосфатидилинозит-3-киназа (PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase) рассматривается как один из важнейших регуляторных белков, находящийся на пересечении различных сигнальных путей и контролирующий ключевые функции клетки. Обнаруженная у PI3K двойная ферментативная активность (липид- и протеинкиназная), как и способность PI3K активировать целый ряд сигнальных белков, включая некоторые онкобелки, определяет принципиальное значение PI3K в регуляции таких функций клетки, как рост и выживаемость, старение, опухолевая трансформация. Центральное место среди эффекторов PI3K занимают митоген-проводящие сигнальные белки: протеинкиназа C, фосфоинозитидзависимые киназы, малые G-белки, MAP (mitogen activated protein) киназы, активируемые либо при взаимодействии с липидными продуктами PI3K, либо через PI3K-зависимое белковое фосфорилирование. Антиапоптотическое действие PI3K реализуется через активацию сигнальных белков другого ряда – протеинкиназы B (PKB) и PKB-зависимых ферментов (GSK-3, ILK). Особую роль играет PI3K в процессе опухолевой трансформации. PI3K не только обладает самостоятельной онкогенной активностью, но и образует комплексы с некоторыми из вирусных и клеточных онкобелков (src, gas, ras, alb, T-антиген), для реализации трансформирующего потенциала которых требуется обязательное присутствие PI3K в клетке. Предполагается, что в основе трансформирующего действия PI3K лежат комплексные изменения клеточных сигнальных путей: возникновение постоянно генерируемого PI3K-зависимого митогенного сигнала и активация некоторых протонкогенов (src, gas, ras и др.), стимуляция PI3K/PKB-пути, приводящая к частичному блоку апоптоза и увеличению выживаемости клеток и реорганизация актинового цитоскелета.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фосфатидилинозит-3-киназа, фосфоинозитиды, MAP-киназы, протеинкиназа B, пролиферация, апоптоз, опухолевая трансформация, старение.

Мембранные фосфолипиды, и в частности фосфатидилинозитол, относят к ключевым соединениям, участвующим в регуляции деления клеток. В течение многих лет предполагалось, что роль фосфатидилинозитола (PtdIns) и его производных (PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> и PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) в передаче митогенного сигнала ограничивается гидролизом этих соединений под действием фосфолипазы C и образованием таких известных медиаторов клеточного деления, как диацилглицерин и инозитолфосфаты. В последние годы эти представления претерпели существенные изменения и в первую очередь благодаря открытию и активному изучению фосфатидилинозит-3-киназы (PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase) – фермента, фосфорилирующего PtdIns в 3ОН-положении инозитольного кольца.

Первоначальный интерес исследователей к этому ферменту был обусловлен известной способностью PI3K образовывать комплексы с не-

которыми вирусными онкобелками, такими как v-src, v-ros [1, 2], а также участием внутриклеточной PI3K в процессе вирусной трансформации [3]. Уже позднее, в 1997 г., была продемонстрирована возможность опухолевой трансформации клеток в результате трансфекции ДНК, содержащей фрагмент вирусного или клеточного гена PI3K [4]. Параллельно развивающиеся исследования биохимических свойств PI3K привели к довольно неожиданным результатам. Оказалось, что состоящая из двух субъединиц (регуляторной p85 и каталитической p110) молекула PI3K обладает не только липидкиназной, но и протеинкиназной активностью [5, 6]. Для активации димерной p85/p110-молекулы PI3K требуется фосфорилирование по тирозину, осуществляемое с помощью рецепторных (рецепторы тромбоцитарного, инсулиноподобного, эпидермального факторов роста) или нерепцепторных (p60-src) тирозинкиназ [7–9]. В эксперимен-

тах с использованием специфических ингибиторов PI3K и/или при трансфекции клеток различными вариантами гена PI3K было установлено, что PI3K принимает участие в регуляции как минимум двух важнейших функций клеток: клеточного деления (являясь необходимым компонентом сигнального пути, инициируемого ростовыми факторами) и апоптоза (препятствуя его развитию в клетках) [3, 10–12].

Безусловный прогресс, достигнутый в последние годы в изучении механизма действия PI3K, позволил установить природу медиаторов, опосредующих основные эффекты PI3K. Так, каскад событий, приводящих в итоге к подавлению апоптоза, инициируется образованием комплекса между PtdIns-фосфатами – продуктами реакции PI3K – и протеинкиназой В (PKB, известной также под названиями Akt или Akt/PKB) [13, 14]. Последняя играет важную роль в регуляции активности целого ряда генов, прямо или косвенно контролирующих апоптоз [15–17]. Участие PI3K в передаче митогенного сигнала реализуется по иной схеме. Несмотря на то, что традиционно фосфатидилинозитол и его производные рассматривались в качестве основных компонентов передачи митогенного сигнала, оказалось, что роль PI3K в регуляции клеточного деления не ограничивается только синтезом этих соединений. Сравнительно недавно было показано, что PI3K может непосредственно регулировать активность отдельных компонентов RAS/RAF/ERK-митогенного пути, образуя комплексы с некоторыми сигнальными белками и действуя в этом случае как серин-треониновая протеинкиназа [5, 6, 18].

Среди других важнейших функций PI3K, прямо или косвенно связанных с передачей митогенного сигнала, следует выделить участие в рецепторной down-регуляции (эндоцитозе и деградации активированных рецепторов ростовых факторов) и регуляции синтеза лизосомальных ферментов [19, 20], а также участие PI3K в реорганизации актинового цитоскелета в процессе опухолевой трансформации и/или митогенной стимуляции клеток [21].

В целом PI3K рассматривается сегодня как один из важнейших регуляторных белков, находящийся на пересечении различных сигнальных путей и контролирующий ключевые функции клетки. Активация PI3K в опухолевых клетках после облучения или стресса [9, 22] наряду с описанным выше антиапоптотическим эффектом PI3K свидетельствует о важной роли, которую играет этот фермент в регуляции устойчивости опухолевых клеток к действию повреждающих агентов и чувствительности злокачественных опухолей к химио- и радиотерапии.

## PI3K: ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА

Фосфатидилинозитол-3-киназа представляет собой гетеродимер, состоящий из регуляторной субъединицы с молекулярной массой 85 кДа (p85) и каталитической субъединицы 110 кДа (p110) [9, 22]. При клонировании cДНК было выявлено не менее пяти форм каждой из субъединиц [23–27]. В состав регуляторной p85-субъединицы входит несколько доменов, в том числе: SH3-домен, два пролин-богатых участка и два SH2-домена, разделенные iSH2 (inter SH2)-участком (рис. 1). Через iSH2-домен происходит взаимодействие p85 с p110-субъединицей, тогда как два SH2-домена ответственны за связывание гетеродимера p85/p110 с рецепторными тирозинкиназами [9, 28]. Предполагается, что благодаря способности регуляторной p85-субъединицы взаимодействовать как с рецепторными тирозинкиназами, так и с каталитической p110-субъединицей происходит транспортировка последней к клеточной мембране, где и инициируется образование комплекса фермента с фосфолипидным субстратом [9, 24].

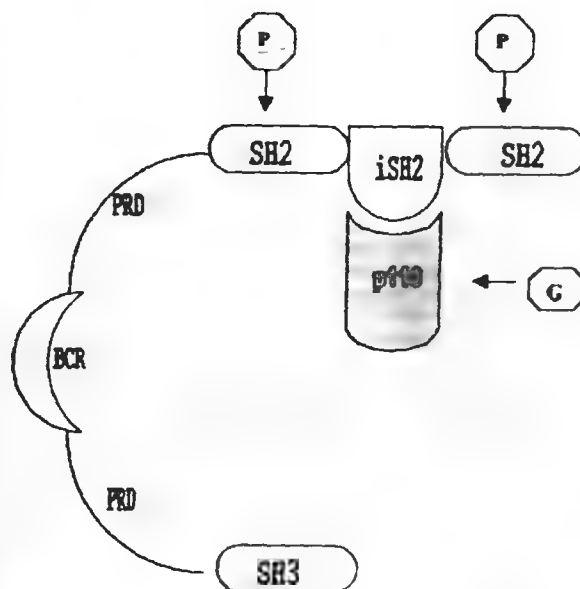


Рис. 1. Схематическая структура p85/p110-гетеродимера. В состав регуляторной p85-субъединицы входят (начиная с N-конца) SH3-домен, два пролин-богатых участка (PRD, proline rich domain), разделенные BCR-гомологичным доменом (BCR, breakpoint cluster region), и два SH2-домена, разделенные iSH2 (inter SH2)-участком, через который происходит связывание с p110-субъединицей. Стрелками указаны места связывания гетеродимера с основными активаторами PI3K: фосфотирозиновыми белками (P) и малыми G-белками (G)

Каталитическая p110-субъединица PI3K гомологична протеинкиназам и обладает одновременно серин-треониновой протеинкиназной и фосфоинозитидкиназной активностью [5, 6, 22, 29, 30]. Фосфорилирование PtdIns и фосфоинозитидов (PtdIns(4)P, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) происходит в D3-положении инозитольного кольца и приводит к образованию соответственно PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> и PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. В настоящее время выделяют три основных класса, составляющих семейство PI3K. Для всех ферментов семейства PI3K характерно сохранение протеинкиназной активности, различия касаются преимущественно субстратной специфичности фосфоинозитидкиназного участка. Так, к первому (основному) классу относят p85/p110-гетеродимеры, использующие в качестве субстрата все фосфоинозитиды: PtdIns, PtdIns(4)P и PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Все чаще в отношении этого класса используют название «фосфоинозитид-3-киназы», более корректно отражающее их субстратную специфичность по сравнению с традиционным термином «фосфатидилинозитол-3-киназа». Ко второму классу PI3K относят ферменты, фосфорилирующие преимущественно PtdIns и PtdIns(4)фосфат. И, наконец, в третий класс включена PI3K, обладающая дополнительными специфическими функциями транспортера белков и сходная по структуре и функциям с дрожжевым аналогом PI3K – vps34p (vacuolar protein sorting). В отличие от предыдущих форм этот фермент может использоваться в качестве субстрата только PtdIns [31–33].

Два основных процесса лежат в основе активации PI3K: образование гетеродимера p85/p110 и взаимодействие гетеродимера с белками-активаторами. Как уже отмечалось, связывание каталитической и регуляторной субъединиц происходит через iSH2-домен последней. Само по себе образование гетеродимера p85/p110 не сопровождается заметной активацией фермента. Более того, в ряде работ отмечается снижение активности каталитической субъединицы при образовании комплекса p85/p110 *in vitro* [28]. Для последующей активации гетеродимера требуется дополнительное взаимодействие со специфическими белками-активаторами [34–36]. Ведущее место среди них занимают белки, содержащие фосфорилированные по тирозину последовательности, в частности представители рецепторных тирозинкиназ (рецепторы тромбоцитарного, эпидермального, инсулиноподобного факторов роста), а также некоторые нерепцепторные тирозинкиназы (p60-src) [7–9]. Связывание белков-активаторов через фосфотирозинные участки с SH2-доменами регуляторной субъединицы вызывает конформационные изменения гетеродимера и приводит в итоге к актива-

ции фермента (рис. 1) [28]. Однако этим не исчерпываются пути активации PI3K. Дополнительная активация гетеродимера может происходить при непосредственном взаимодействии некоторых клеточных белков с каталитической субъединицей. Классическим примером такой активации является образование комплекса между p21-gas и p110 с последующей активацией PI3K [37–39]. Вероятно, именно множественность путей активации PI3K наряду с полисубстратностью и двойной (липидкиназной и протеинкиназной) активностью фермента и определили ту ключевую роль, которую играет PI3K в регуляции роста и выживаемости клеток.

### РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА КЛЕТОК. МЕСТО PI3K СРЕДИ ОСНОВНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Исследования последних лет показали, что участие PI3K в регуляции деления клеток реализуется как минимум по двум возможным направлениям: через продукцию фосфоинозитидов (липидкиназная активность PI3K) и через непосредственное взаимодействие PI3K с некоторыми сигнальными клеточными белками, при котором основное значение может иметь протеинкиназная активность PI3K [5, 6, 22, 29, 30].

Традиционные представления о роли фосфоинозитидов в регуляции клеточного деления основаны на использовании этих соединений в качестве субстрата фосфолипазой C – ферментом, активируемым рецепторными тирозинкиназами при стимуляции деления клеток. Накопление в клетках продуктов гидролиза фосфоинозитидов (диацилглицерина и инозитфосфатов) под действием фосфолипазы C приводит к активации протеинкиназы C, стимулируя тем самым один из важнейших сигнальных путей клетки [40–43]. Однако в дальнейшем было установлено, что фосфоинозитиды могут иметь и самостоятельное значение в передаче митогенного сигнала, обладая способностью непосредственно взаимодействовать с отдельными сигнальными белками. Ниже мы рассмотрим роль фосфоинозитидов в активации PKB – протеинкиназы, преимущественно участвующей в регуляции клеточного апоптоза. Что касается белков – медиаторов клеточного деления, то здесь в первую очередь следует отметить протеинкиназу C (PKC). Оказалось, что активация PKC может происходить не только при связывании диацилглицерина, образующегося при гидролизе фосфолипидов, но и в результате взаимодействия с липидными продуктами PI3K [44]. Значительный прогресс в изучении механизмов регуляции PKC был до-



стигнут после открытия нового семейства серин-треониновых протеинкиназ – PDK (phosphoinositide-dependent kinases) [45, 46]. Ферменты группы PDK активируются липидными продуктами PI3K – 3ОН-фосфоинозидами (откуда и произошло название этого семейства) и ответственны за фосфорилирование и активацию ряда сигнальных протеинкиназ, в том числе PKB и PKC [45–47]. Таким образом, можно выделить два этапа PI3K-зависимой активации протеинкиназы С: взаимодействие PKC с диацилглицерином – продуктом гидролиза фосфоинозити-

дов, и фосфорилирование протеинкиназы С ферментами семейства PDK (рис. 2). Кроме того, следует отметить и результаты, полученные при изучении связывания фосфоинозитидов с SH2-содержащими белками. Было показано, что один из продуктов PI3K – PtdIns(3, 4, 5)P<sub>3</sub> – взаимодействует с SH2-доменами белков, конкурируя с фосфотирозиновыми пептидами [48]. Нельзя исключить, что подобный эффект может лежать в основе дополнительного пути активации SH2-содержащих сигнальных белков, независимого от рецепторных тирозинкиназ.

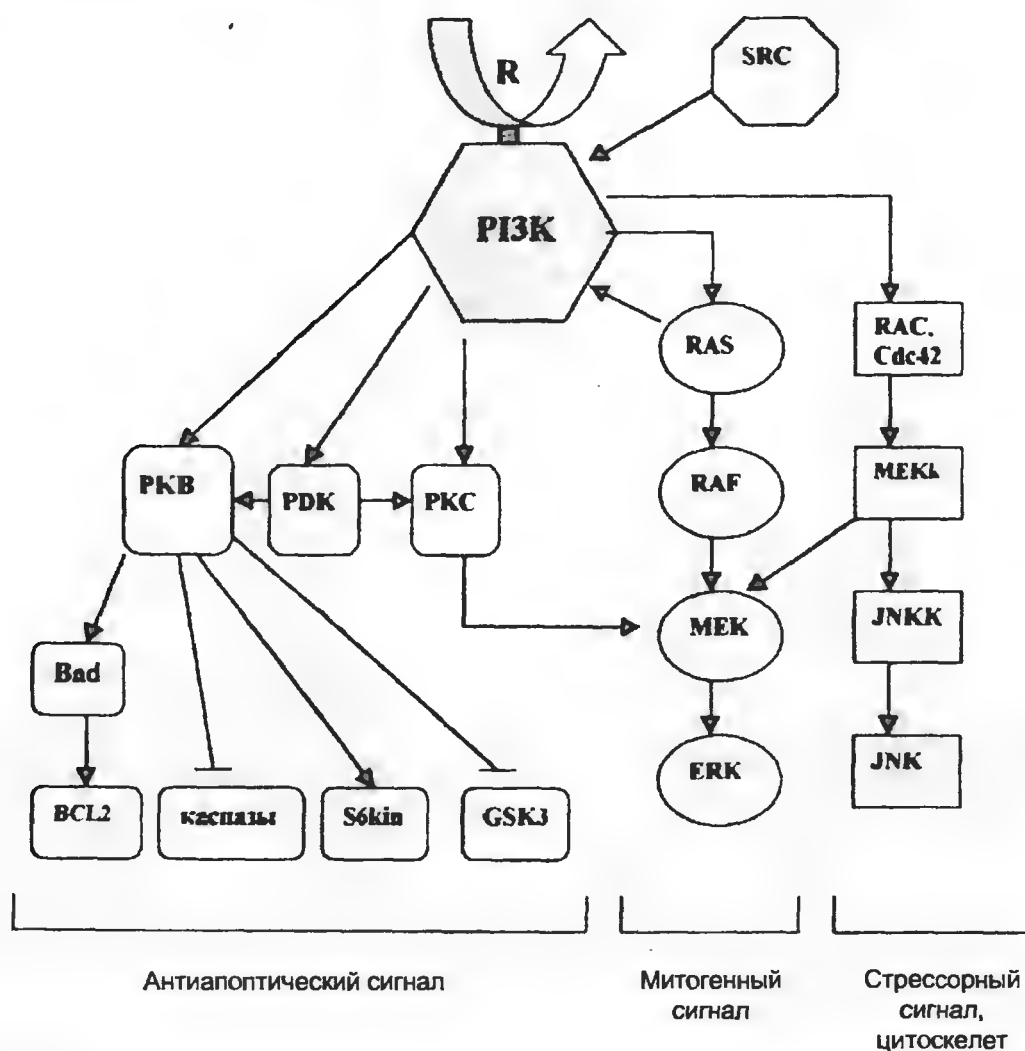


Рис. 2. Модель, иллюстрирующая участие PI3K в регуляции сигнальных путей клетки. PI3K активируется при взаимодействии с рецепторными (рецепторы ростовых факторов) или нерецепторными (p60-src) тирозинкиназами. К числу основных down-stream-эффекторов PI3K относятся PKB, ответственная за передачу антиапоптотического сигнала; RAS/ERK – ведущий митоген-проводящий путь и RAC/JNKK/JNK – путь, частично контролирующий перенос митогенного сигнала, но главным образом участвующий в регуляции других функций клетки, таких как реакция на стресс, реорганизация актинового цитоскелета

Отдельный интерес представляет участие PI3K в процессе рецепторной down-регуляции, включающей эндоцитоз и деградацию активированных рецепторов ростовых факторов. Как известно, вслед за связыванием лиганда с рецептором ростового фактора и активацией его фосфотирозинкиназного домена происходит интернализация рецептора во внутриклеточные везикулы с последующей деградацией в лизосомах – путь, названный рецепторной down-регуляцией [49–51]. Оказалось, что этот путь, и в частности транспортировка активированного рецептора в лизосомы, находится под контролем со стороны PI3K [19, 52, 53]. Так, при исследовании down-регуляции рецептора тромбоцитарного фактора роста было показано, что мутации фосфотирозинового участка молекулы рецептора, ответственного за связывание с PI3K, практически полностью блокируют переход рецептора в лизосомы [19]. Аналогичный эффект продемонстрирован при действии на клетки специфического ингибитора PI3K – вортманина [52, 53]. Но PI3K обладает способностью и непосредственно регулировать активность лизосомальных ферментов, стимулируя транспорт синтезированных *de novo* гидролаз в лизосомы [20].

Способность непосредственно связываться с некоторыми клеточными белками, как и обнаруженная у PI3K, наряду с липидкиназной, протеинкиназная активность, открыла новые возможности для изучения роли этого фермента в сигнальных путях клетки. Гетеродимер p85/p110 образует *in vivo* комплексы с довольно широким спектром клеточных молекул, включая тирозинкиназы, Grb2, p21-gas, gas, Cdc42, тубулин и др. [38, 39, 54–58]. Принципиальное значение для понимания роли PI3K в регуляции RAS/RAF/ERK-сигнального пути имеет образование комплекса между каталитической субъединицей PI3K и p21-gas (рис. 2). PI3K связывается только с GTP-формой gas и результатом подобного взаимодействия является активация PI3K, наблюдаемая как *in vitro*, так и *in vivo* [38, 39]. Подобный же эффект активации PI3K наблюдается и при связывании гетеродимера p85/p110 с другими G-белками, в частности gas и Cdc42 [54–58]. В то же время образование комплекса между PI3K и p21-gas сопровождается увеличением количества активированной (GTP-связанной) формы gas [59]. Более того, оказалось, что присутствие PI3K необходимо как для стимуляции RAS/RAF/ERK-пути, так и для gas-индуцированной трансформации клеток, причем в некоторых случаях подавление активности PI3K может приводить к полному блоку трансформации [21]. Следует заметить, что взаимная регуляция между PI3K и p21-gas носит довольно сложный характер и выходит за

рамки линейной схемы передачи митогенного сигнала. Предполагается, что PI3K вызывает активацию p21-gas (возможно, через мобилизацию в клеточную мембрану SOS-белков) и одновременно происходит активация самой PI3K за счет образования комплекса с GTP-формой gas и/или других G-белков [44].

Однако значение PI3K в RAS/RAF/ERK-сигнальном пути отнюдь не ограничивается влиянием на p21-gas. Сравнительно недавно была продемонстрирована важная роль серин-треониновой протеинкиназной активности PI3K в регуляции клеточных MAP-киназ. В экспериментах с различными классами PI3K, различающимися по активности липид- и протеинкиназного компонентов, установлено, что в активации клеточных MAP-киназ принимает участие протеинкиназный компонент PI3K [18]. В то же время уровень синтеза фосфоинозитидов – липидных продуктов PI3K – не оказывает существенного влияния на активность MAP-киназ [18]. Таким образом, общая схема включения PI3K в митоген-проводящие сигнальные пути клетки складывается из нескольких стадий, основными из которых являются: активация PI3K за счет связывания гетеродимера p85/p110 с фосфорилированными по тирозину белками и/или малыми G-белками (p21-gas, gas, Cdc42); синтез 3ОН-фосфоинозитидов, служащих в дальнейшем субстратом для фосфолипазы C и источником диацилглицерина и инозитолфосфатов и активаторами ряда протеинкиназ (PKB, PKC, PDK), с которыми фосфоинозитиды способны непосредственно взаимодействовать, и фосфорилирование по серин-треонину вторичных мессенджеров PI3K и активация MAP-киназ (рис. 2). Но схема включения PI3K в клеточный метаболизм была бы неполной без рассмотрения роли PI3K в регуляции стресс-активируемых сигнальных путей.

## PI3K И РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА

Среди клеточных белков, также являющихся мишенями для PI3K, особое место занимают соединения, участвующие в ответе клеток на стрессорные воздействия. Более того, если участие PI3K в регуляции деления клеток носит скорее вторичный характер, то в регуляции выживаемости и устойчивости клеток к стрессорным воздействиям этому ферменту принадлежит ведущая роль. К такому выводу исследователи пришли во многом благодаря открытию и изучению PI3K/PKB-зависимого сигнального пути [13–17, 60].

Как известно, митогенная активность ростовых факторов и цитокинов не всегда коррелиру-

ет с их способностью предотвращать клеточную гибель. Классическими примерами соединений с антиапоптическим действием являются тромбоцитарный и инсулиноподобный факторы роста. В то же время фактор роста фибробластов или эпидермальный ростовой фактор, несмотря на их высокую митогенную активность, практически не влияют на выживаемость клеток [61–63]. Частичное объяснение этим фактам было найдено при сравнительном исследовании сигнальных путей, активируемых ростовыми факторами в клетках-мишенях. Оказалось, что стимуляция традиционного RAS/RAF/ERK-пути, как правило, не сопровождается существенным антиапоптическим эффектом [64, 65]. Способность предотвращать апоптоз была обнаружена у серин-треониновой протеинкиназы B (PKB), активируемой некоторыми из ростовых факторов [63, 64]. При исследовании путей активации PKB установлено, что в роли медиатора, передающего сигнал на PKB, выступает PI3K [15–17, 64, 66].

В настоящее время PI3K рассматривается в качестве одного из основных внутриклеточных факторов, ответственных за передачу антиапоптического сигнала и контролирующих выживаемость клеток. Так, гиперэкспрессия PI3K в клетках сопровождается выраженным антиапоптическим эффектом и приводит к существенному увеличению выживаемости клеток при облучении [15–17, 65, 67]. Обратный эффект – стимуляция апоптоза и снижение выживаемости клеток – наблюдается при действии специфических ингибиторов PI3K [11, 12, 65, 67]. Результаты многих работ свидетельствуют о том, что ключевым событием в реализации антиапоптического действия PI3K является активация PKB, инициируемая образованием комплекса между липидными продуктами PI3K и PKB [13–17]. Активация PKB проходит две основные стадии: связывание PH (pleckstrin homology)-домена фермента с основными продуктами липидкиназной реакции, катализируемой PI3K – PtdIns(3)P и/или PtdIns(3,4)P2 [13, 14, 66], и фосфорилирование в положении Thr-308 киназой PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) (рис. 2) [45, 46]. PI3K-Зависимая активация PKB протекает независимо от действия PI3K на RAS/RAF/ERK-путь: если в первом случае достаточно связывания липидных продуктов PI3K с PKB, то для реализации действия PI3K на MAP-киназы, как было отмечено выше, необходимым условием является участие протеинкиназного компонента PI3K [18].

Как дальше передается сигнал от PKB и какова природа сигнальных путей, берущих начало от PKB и контролирующих выживаемость клеток? В настоящее время различают несколько независимых механизмов, активируемых через

PKB и способных привести к блоку апоптоза (рис. 2). Прежде всего следует отметить, что среди прямых мишеней PKB не было обнаружено основных белков семейства Bcl, относящихся к одним из наиболее распространенных негативных регуляторов апоптоза [65]. Исключение составляет лишь Bad, фосфорилирование которого киназой PKB предотвращает его связывание с Bcl-2 [68, 69]. Установлено, что медиаторами PKB являются протеазы семейства каспаз, активируемые в процессе апоптоза. PKB подавляет активность этих протеаз, что может лежать в основе его антиапоптического эффекта [65]. К другим возможным эффекторам PKB относят p70 S6-киназу, которая обладает выраженным антиапоптическим действием и активность которой возрастает при прямом фосфорилировании киназой PKB [46, 64]. И, наконец, результаты последних исследований выявили важную роль в индукции программированной клеточной гибели фермента GSK-3 (glycogen synthetase kinase-3). Один из путей регуляции GSK-3 – его прямое фосфорилирование киназой PKB, что вызывает резкое снижение активности GSK-3 [70, 71].

Безусловно, представленная схема сигнальных путей, инициируемых PI3K и PKB, далека от завершения. С каждым днем расширяются представления о природе вторичных мессенджеров, участвующих в реализации сигнала от PI3K и PKB, появляются новые данные о роли этих соединений в регуляции ответа клеток на стрессорные воздействия. Так, в недавних работах появились данные об участии ассоциированных с интегрином протеинкиназах (ILK, integrin-linked kinase) в реализации антиапоптического эффекта PI3K [71], активно обсуждается вопрос о роли стресс-активируемых киназ (семейство JNK) в регуляции апоптоза и об их участии в передаче сигнала от PI3K и PKB [72, 73].

## PI3K И СТАРЕНИЕ КЛЕТОК

Способность PI3K контролировать такие кардинальные клеточные функции, как пролиферация и апоптоз, послужила стимулом для изучения роли PI3K в регуляции другой важнейшей функции клеток – старения. Известно, что феномен клеточного старения развивается по достижении клетками предела Хейфлика, т.е. после прохождения определенного количества делений и перехода клеток в состояние покоя [74]. По мнению ряда исследователей, досрочный переход клеток в состояние покоя и инициацию клеточного старения можно расценивать как одну из защитных программ, сходную с программированной клеточной гибелью (апопто-

зом) и активируемую при действии на клетки повреждающих агентов [75]. Косвенным свидетельством справедливости этого предположения является тот факт, что соединения, участвующие в передаче митогенного сигнала и обладающие апоптотическим действием, в частности церамид, способны в отличие от традиционных митогенов эффективно влиять на скорость клеточного старения [76].

К настоящему времени получено несколько экспериментальных доказательств, свидетельствующих об участии PI3K в регуляции старения. Прежде всего следует отметить эксперименты на *Caenorhabditis elegans*, в которых была показана гомология одного из генов, контролирующего старение, – *Age1*, с геном, кодирующим каталитическую субъединицу PI3K у млекопитающих, и продемонстрировано участие *Age1* в регуляции развития *C. elegans* [77]. Убедительные доказательства участия PI3K в регуляции клеточного старения получены в экспериментах на нормальных фибробластах *in vitro*. Сравнительный анализ действия на фибробласты ингибитора PI3K – LY2940002 и ингибитора MEK-1 (киназы, фосфорилирующей ERK1/ERK2) – PD58029 показал, что оба соединения вызывают торможение пролиферации клеток. При этом только в первом случае (при действии ингибитора PI3K) задержка клеточного роста сопровождается появлением комплекса специфических фенотипических изменений, обычно характерного для стареющих фибробластов: активации галактозидазы, повышения экспрессии гена коллагеназы и подавления экспрессии специфического маркера пролиферирующих фибробластов гена EPC-1 (early population doubling level cDNA 1) [78]. Складывается впечатление, что при PI3K-зависимой регуляции клеточного старения наиболее значительны компоненты антиапоптотического сигнального пути, контролируемого PI3K, но независимого от RAS/RAF/ERK-каскада. Видимо, именно активация антиапоптотического пути (и в первую очередь PKB) во многом определяет участие PI3K в регуляции клеточного старения.

### РОЛЬ PI3K В ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК

Как уже отмечалось, первоначальный интерес исследователей к PI3K был во многом обусловлен участием этого фермента в процессе злокачественной трансформации клеток. Некоторые из вирусных онкобелков, в частности src, abl, T-антиген, образуют комплексы с PI3K и для реализации их трансформирующего потен-

циала требуется обязательное присутствие PI3K в клетке. Как показали эксперименты с мутантными формами таких белков, потеря способности к комплексообразованию с PI3K влечет за собой резкое снижение трансформирующей активности онкобелков [8, 79–82]. Результатом образования комплексов онкобелков с PI3K являются активация PI3K и увеличение уровня PtdIns(3, 4)P2/PtdIns(3, 4, 5)P3, причем уменьшение концентрации внутриклеточных фосфоинозитидов приводит к снижению эффективности трансформации [3, 81, 83].

Вопрос о самостоятельной онкогенной активности PI3K долгое время оставался открытым, пока в 1997 г. вирусный аналог каталитической субъединицы p110 PI3K не был обнаружен в составе генома ASV 16 (avian sarcoma virus 16) [4]. Исследования трансформирующего потенциала гена, кодирующего каталитическую субъединицу p110 и названного p3k, показали, что как вирусный, так и клеточный варианты этого гена вызывают морфологическую трансформацию эмбриональных фибробластов цыплят *in vitro* [4]. Которые из компонентов PI3K-индуцируемой сигнальной цепи принимают непосредственное участие в злокачественной трансформации клеток? На сегодняшний день не вызывает сомнения участие в опухолевой трансформации липидных продуктов PI3K и активируемых ими протеинкиназ, в частности описанной выше протеинкиназы B (PKB), кодируемой протоонкогеном Akt. Установлено, что трансформация клеток геном p3k сопровождается резким повышением активности PKB и скорости фосфорилирования эндогенных субстратов [4]. Большое значение в процессе PI3K-зависимой трансформации отводится стимуляции RAS/RAF/ERK-киназного каскада и увеличению активности транскрипционного фактора AP-1 [84]. Вероятно, в основе трансформирующего действия PI3K лежат комплексные изменения клеточных сигнальных путей: возникновение постоянно генерируемого PI3K-зависимого митогенного сигнала, активация некоторых протоонкогенов (src, gas, гас и др.) и стимуляция PKB-пути, приводящая к частичному блоку апоптоза и увеличению выживаемости клеток (рис. 2).

Отдельного внимания заслуживают работы, в которых исследовалась роль PI3K в формировании актинового цитоскелета. Хорошо известно, что стимуляция клеточной пролиферации, как и опухолевая трансформация клеток, сопровождаются реорганизацией актинового цитоскелета [21, 85–87]. Результаты последних исследований свидетельствуют, что одно из ключевых мест в регуляции этого процесса принадлежит PI3K. Установлено, что активация PI3K яв-

ляется необходимым условием реорганизации актиновых филаментов клеток, причем в качестве возможного эффектора PI3K рассматривается *rac*, принадлежащий к группе малых G-белков и принимающий участие в передаче сигнала через стресс-активируемые киназы семейства JNK (рис. 2). [54–58, 88–90]. Другой путь, через который PI3K может регулировать процесс сборки актина, основан на собственно липидкиназной активности PI3K. Главную роль здесь играет один из субстратов PI3K – PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, взаимодействие которого с актинсвязывающими белками стимулирует процесс актиновой полимеризации [55, 87, 91–94]. Активация ферментов, метаболизирующих этот фосфоинозитид (фосфолипаза C и PI3K), в том числе при действии на клетки митогенных/онкогенных факторов, приводит к снижению количества связанного с актином PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> и в итоге – к деполимеризации актина [95, 96].

Обнаруженная у PI3K онкогенная активность свидетельствует о важной роли этого фермента в процессе канцерогенеза и роста опухолей. Действительно, в отдельных работах отмечались изменения уровня фосфоинозитидов при развитии злокачественных новообразований [97]. В наших исследованиях при анализе экспрессии PI3K в опухолях молочной железы в 79% была выявлена существенная активация PI3K по сравнению с прилегающей нормальной тканью [98]. Сравнительно недавно установлено, что действие некоторых генов – супрессоров опухолевого роста – реализуется через подавление активности PI3K. В частности, такими свойствами обладает продукт гена-супрессора PTEN/MMCA1 – фосфатаза, дефосфорилирующая PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> [99]. Специфические ингибиторы PI3K (вортманин, LY 294002) вызывают существенное торможение роста клеток в культуре и препятствуют опухолевой трансформации *in vitro* [84, 100, 101]. Однако вопрос об их противоопухолевой активности, как и в целом вопрос об использовании антагонистов или ингибиторов PI3K в терапии злокачественных опухолей, еще далек от разрешения и требует дальнейшего изучения.

В целом прогресс, достигнутый за последние годы в изучении PI3K, поставил этот фермент в один ряд с ведущими сигнальными белками клетки. Множественность путей активации PI3K наряду с уникальными биохимическими свойствами – полисубстратностью и двойной (липидкиназной и протеинкиназной) активностью – определяет принципиальное значение PI3K в регуляции основных функций клетки: роста и выживаемости клеток, старения, опухолевой трансформации. Центральное место среди эффекторов

PI3K занимают митоген-проводящие сигнальные белки (протеинкиназа C, фосфоинозитидзависимые киназы, малые G-белки, MAP-киназы), активируемые либо при взаимодействии с липидными продуктами PI3K, либо через PI3K-зависимое белковое фосфорилирование [38, 39, 45–47, 54, 58]. Активация сигнальных белков другого ряда – протеинкиназы B и PKB-зависимых ферментов (GSK-3, ILK) – лежит в основе антиапоптотического действия PI3K (рис. 2) [13–17, 70, 71].

Однако механизм многих эффектов PI3K еще остается неясным и в первую очередь это относится к участию PI3K в регуляции опухолевой трансформации клеток. PI3K не только обладает самостоятельной онкогенной активностью, но и потенцирует действие других онкогенов, активируя и усиливая трансформирующую активность многих из известных онкобелков (*rac*, *rac*, Akt, src) [8, 79–83]. Вместе с тем активность PI3K резко повышается при действии на клетки повреждающих факторов [9, 15–17, 22]. Нельзя исключить, что подобная активация PI3K может иметь существенное значение и в процессе канцерогенеза, приводя, во-первых, к торможению апоптоза клеток с поврежденной структурой ДНК и, во-вторых, вызывая дополнительную активацию клеточных онкобелков и стимулируя нерегулируемый рост клеток.

С проблемой опухолевой трансформации тесно связана и другая функция PI3K – регуляция клеточного старения. Подавление активности PI3K увеличивает скорость старения нормальных клеток [78], но механизм, посредством которого PI3K контролирует старение, и значение отдельных эффекторов PI3K пока неизвестны. Можно лишь предположить, что как и в случае PI3K-индуцированной опухолевой трансформации, большую роль в регуляции скорости старения может иметь активация митогензависимых белков и (что представляется наиболее важным) постоянно генерируемый PI3K антиапоптотический сигнал. Впрочем, работы в этом направлении только начинаются и неясно, изменятся ли активность PI3K по мере старения клеток и приведет ли повышение экспрессии PI3K к существенному снижению скорости старения. Несомненно, ближайшие исследования дадут ответы на эти и многие другие вопросы, связанные с механизмом действия PI3K в нормальных и опухолевых клетках.

В заключение следует отметить, что с идентификацией PI3K в качестве одного из центральных сигнальных белков удалось связать многие, казалось бы, разрозненные события, происходящие в клетке при действии митогенных и онкогенных факторов или стрессе. Постоянно появляются работы, в которых описыва-



ются новые эффекторы РІЗК или устанавливается связь известных клеточных белков с РІЗК-зависимыми сигнальными путями. Мы все больше приближаемся к пониманию основных принципов координированной регуляции биохимических сигнальных путей и их значения для фун-

даментальных свойств клетки: роста, старения, трансформации.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 98-04-48200).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sugimoto, Y., Whitman, M., Cantley, L.C., and Erikson, R.L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2117–2121.
2. Macara, I.G., Marinetti, G.V., and Balduzzi, P.C. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2728–2732.
3. Cantley, L.C., Auger, K., Carpenter, C.L., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., and Soltoff, S. (1991) *Cell*, **64**, 281–302.
4. Chang, H.W., Aoki, M., Fruman, D., Auger, K., Bellacosa, A., Tsichlis, P., Cantley, L.C., Roberts, T., and Vogt, P. (1997) *Science*, **276**, 1848–1850.
5. Carpenter, C.L., Auger, K., Duckworth, B., Hou, W., Schaffhausen, B., and Cantley, L.C. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1657–1665.
6. Dhang, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M., Gout, I., Totty, N., Truong, O., Vicendo, P., Yonesawa, K., Kasuga, M., Courtneidge, S., and Waterfield, M. (1994) *EMBO J.*, **13**, 522–533.
7. Ruderman, N., Kapeller, R., White, M., and Cantley, L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1411–1415.
8. Fukui, Y., and Hanafusa, H. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1651–1658.
9. Kapeller, R., and Cantley, L.C. (1994) *BioEssays*, **16**, 565–576.
10. Yao, R., and Cooper, G.M. (1995) *Science*, **267**, 2003–2006.
11. Scheid, M.P., Lauener, R.W., and Duronio, V. (1995) *Biochem. J.*, **312**, 159–162.
12. Minshall, C., Arkins, S., Freund, G.G., and Kelley, K.W. (1996) *J. Immunol.*, **156**, 939–947.
13. Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., and Toker, A. (1997) *Science*, **275**, 665–668.
14. Klippel, A., Kavanaugh, W., Pot, D., and Williams, L.T. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 338–345.
15. Kauffmann-Zeh, A., Rodrigues-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, G., Coffey, P., Downward, J., and Evan, G. (1997) *Nature*, **385**, 544–548.
16. Khwaja, A., Rodrigues-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P., and Downward, J. (1997) *EMBO J.*, **16**, 2783–2793.
17. Kulik, G., Klippel, A., and Weber, M. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1595–1606.
18. Bondeva, T., Pirola, L., Burgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R., and Wymann, M. (1998) *Science*, **282**, 293–296.
19. Joly, M., Kazlauskas, A., Fay, F., and Corvera, S. (1994) *Science*, **263**, 684–687.
20. Brown, W., DeWald, D., Emr, S., Plutner, H., and Balch, W. (1995) *J. Cell Biol.*, **130**, 781–796.
21. Rodrigues-Viciana, P., Warne, P., Khwaja, A., Marte, B., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M., Ridley, A., and Downward, J. (1997) *Cell*, **89**, 457–467.
22. Carpenter, C.L., Duckworth, B., Auger, K., Cohen, B., Schaffhausen, B., and Cantley, L.C. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 19704–19711.
23. Otsu, M., Hiles, L., Gout, I., Fry, M., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhang, R., Hsuan, J., Totty, N., Courtneidge, S., and Waterfield, M. (1991) *Cell*, **65**, 91–104.
24. Skolnik, E., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fisher, R., Drepps, A., Ulrich, A., and Schlessinger, J. (1991) *Cell*, **65**, 83–90.
25. Escobedo, J., Navakasattusas, S., Kavanaugh, W., Milfay, D., Freid, V., and Williams, L. (1991) *Cell*, **65**, 75–82.
26. Pons, S., Asano, T., Glasheen, E., Miralpeix, M., Zhang, Y., Fisher, T., Myers, M., Sun, X., and White, M. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4453–4465.
27. Inukai, K., Anai, M., Van Breda, E., Hosaks, T., Katagiri, H., Funaki, M., Fukushima, Y., Ogihara, T., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., and Asano, T. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 5317–5320.
28. Yu, J., Wjasow, C., and Backer, J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 30199–30203.
29. Whitman, M., Downes, C., Keeler, M., and Cantley, L. (1988) *Nature*, **332**, 644–646.
30. Auger, K., Serunian, L., Soltoff, S., Libby, P., and Cantley, L. (1989) *Cell*, **57**, 167–175.
31. Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhang, R., and Nurnberg, B. (1995) *Science*, **269**, 690–693.
32. MacDougall, L., Domin, J., and Waterfield, M. (1995) *Curr. Biol.*, **5**, 1404–1415.
33. Schu, P., Takegawa, K., Fry, M., Stack, J., Waterfield, M., and Emr, S. (1993) *Science*, **260**, 88–91.
34. Backer, J., Myers, J., Shoelson, S., Chin, D., Sun, X., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E., Shlessinger, J., and White, M. (1992) *EMBO J.*, **11**, 3469–3479.
35. Carpenter, C., Auger, K., Chanudhuri, M., Yoakim, M., Schaffhausen, B., Shoelson, S., and Cantley, L. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 9478–9483.
36. Rordorf-Nikolic, T., van Horn, D., Chen, D., White, M., and Backer, J. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 3662–3666.
37. Kodaki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Rodriguez-Viciana, P., Downward, J., and Parker, P. (1994) *Curr. Biol.*, **4**, 798–806.
38. Rodriguez-Viciana, P., Warne, P., Dhang, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M., Waterfield, M., and Downward, J. (1994) *Nature*, **370**, 527–532.
39. Rodriguez-Viciana, P., Warne, P., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M., and Downward, J. (1996) *EMBO J.*, **15**, 2442–2451.
40. Orr, W., and Newton, J. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 27715–27723.
41. Cazaubon, F., Bormancin, F., and Parker, P. (1994) *Biochem. J.*, **301**, 443–451.
42. Hug, H., and Sarré, T. (1993) *Biochem. J.*, **291**, 329–334.
43. Копнин Б.П. (2000) *Биохимия*.
44. Carpenter, L., and Cantley, L. (1996) *Biochim. et Biophys. Acta*, **1288**, 11–16.
45. Alessi, D., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F., Morrice, N., Norman, D., and Gaffney, P. (1997) *Curr. Biol.*, **7**, 776–789.
46. Alessi, D., Kozłowski, M., Weng, Q-P., Morrice, N., and Auruch, J. (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 69–81.

47. Le Good, J., Ziegler, W., Parekh, D., Alessi, D., Cohen, P., and Parker, P. (1998) *Science*, **281**, 2042–2045.
48. Rameh, L., Chen, C., and Cantley, L. (1995) *Cell*, **83**, 821–830.
49. Chang, C., Lazar, C., Walsh, B., Komuro, M., Kuhn, L., and Tainer, J. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 19312–19320.
50. Lamaze, C., and Schmid, S. (1995) *J. Cell. Biol.*, **129**, 47–54.
51. Opreko, L., Chang, C., Will, B., Burke, P., Gill, G., and Wiley, H. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 4325–4333.
52. Joly, M., Kazlauskas, A., and Corvera, S. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 13225–13230.
53. Shpetner, H., Joly, M., Hartley, D., and Corvera, S. (1996) *J. Cell. Biol.*, **132**, 595–605.
54. Zheng, Y., Bagrodia, S., and Cerione, R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 18727–18730.
55. Tolias, K., Cantley, L., and Carpenter, C. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 17656–17659.
56. Wennstrom, S., Siegbahn, A., Yokote, K., Arvidsson, A., Heldin, C., Mori, S., and Claesson, W. (1994) *Oncogene*, **9**, 651–660.
57. Nobes, C., Hawkins, P., Stephens, L., and Hall, A. (1995) *J. Cell. Sci.*, **108**, 225–233.
58. Hawkins, P., Eguinov, A., Qiu, R., Stokoe, D., Cooke, F., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M., and Stephens, L. (1995) *Curr. Biol.*, **5**, 393–403.
59. Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E., Lammers, R., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 981–990.
60. Gerber, H., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 30336–30343.
61. Fairbairn, L., Cowling, G., Reipert, B., and Dexter, T. (1993) *Cell*, **74**, 823–832.
62. Raff, M., Barres, B., Burne, J., Coles, H., Ishizaki, Y., and Jacobson, M. (1993) *Science*, **262**, 695–700.
63. Harrington, E., Bennett, M., Fanidi, A., and Evan, G. (1994) *EMBO J.*, **13**, 3286–3295.
64. Burgering, B., and Coffey, P. (1995) *Nature*, **376**, 599–602.
65. Kennedy, S., Wagner, A., Conzen, S., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P., and Hay, N. (1977) *Genes Dev.*, **11**, 701–713.
66. Franke, T., Yang, S., Chan, T., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D., Kaplan, D., and Tsichlis, P. (1995) *Cell*, **81**, 727–736.
67. Krasilnikov, M., Adler, V., Fuchs, S., Dong, Z., Haimovitz-Friedman, A., Herlyn, M., and Ronai, Z. (1999) *Mol. Carcinog.*, **24**, 64–69.
68. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Kosmeyer, S. (1996) *Cell*, **87**, 619–628.
69. Zundel, W., and Giaccia, A. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 1941–1946.
70. Cross, D., Alessi, D., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. (1995) *Nature*, **378**, 785–789.
71. Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11211–11216.
72. Kharbanda, S., Saleem, A., Shafman, T., Emoto, Y., Taneja, N., Rubin, E., Weichselbaum, R., Woodgett, J., Avruch, J., Kyriakis, J., and Kufe, D. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 18871–18874.
73. Lopez-Illasaca, M., Li, W., Uren, A., Yu, J., Kazlauskas, A., Gutkind, J., and Heidaran, M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **232**, 273–277.
74. Hayflick, L., and Moorhead, P. (1961) *Exp. Cell Res.*, **25**, 585–621.
75. Wenberg, R. (1997) *Cell*, **88**, 573–575.
76. Venable, M., Lee, J., Smyth, M., Bielawska, A., and Obeid, L. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 30701–30708.
77. Morris, J., Tissenbaum, H., and Ruvkin, G. (1996) *Nature*, **382**, 536–539.
78. Tresini, M., Mawal-Dewan, M., Cristofalo, V., and Sell, C. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 1–4.
79. Whitman, M., Kaplan, R., Schaffhausen, B., Cantley, L., and Roberts, T. (1985) *Nature*, **315**, 239–242.
80. Courtneidge, S., and Heber, A. (1987) *Cell*, **50**, 1031–1043.
81. Varticovski, L., Daley, G., Jackson, P., Baltimore, D., and Cantley, L. (1991) *Mol. Cell Biol.*, **11**, 1107–1113.
82. Freund, R., Dawe, C., Carrol, J., and Benjamin, T. (1992) *Am. J. Pathol.*, **141**, 1409–1417.
83. Fukui, Y., Saltiel, A., and Hanafusa, H. (1991) *Oncogene*, **6**, 407–411.
84. Huang, C., Schmid, P., Ma, W., Schmid, H., and Dong, Z. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 4187–4194.
85. Ровенский Ю.А. (1998) *Биохимия*, **63**, 1204–1221.
86. Bar Sagi, D., and Feramisco, J. (1986) *Science*, **233**, 1061–1068.
87. Janmey, P. (1994) *Annu. Rev. Physiol.*, **56**, 169–191.
88. Minden, A., Lin, A., Claret, F., Abo, A., and Karin, M. (1995) *Cell*, **81**, 1147–1157.
89. Hill, C., Wynne, J., and Treisman, R. (1995) *Cell*, **81**, 1159–1170.
90. Coso, O., Chiariello, M., Yu, J., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J. (1995) *Cell*, **81**, 1137–1146.
91. Hartwig, J., Bokoch, G., Carpenter, C., Janmey, P., Taylor, L., Toker, A., and Stossel, T. (1995) *Cell*, **82**, 643–653.
92. Tolias, K., Couvillon, A., Cantley, L., and Carpenter, C. (1997) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 762–770.
93. Chong, L., Traynor, K., Bokoch, G., and Schwartz, M. (1994) *Cell*, **79**, 507–513.
94. Shibasaki, Y., Ishihara, H., Kizuki, N., Asano, T., Oka, Y., and Yazaki, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 7578–7581.
95. Fukami, K., Furuhashi, K., Inagaki, M., Endo, T., Hatano, S., and Takenawa, S. (1992) *Nature*, **359**, 150–152.
96. Fukami, K., Endo, T., Imamura, M., and Takenawa, T. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 1518–1522.
97. Bordon, A., Hrelia, S., Biagi, P., and Berra, B. (1992) *Int. J. Cancer*, **50**, 402–404.
98. Gershtein, E., Shatskaya, V., and Krasilnikov, M. (1999) *Clin. Chim. Acta*, **287**, 59–67.
99. Wu, X., Senechal, K., Neshat, M., Whang, Y., and Sawyers, C. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15587–15591.
100. Valhos, C., Matter, W., Hui, K., and Brown, R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 5241–5248.
101. Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y., and Matsuda, Y. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 25846–25856.

**PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE – DEPENDENT PATHWAYS:  
THE ROLE IN THE REGULATION OF CELL GROWTH,  
SURVIVAL AND TRANSFORMATION**

**M.A. Krasil'nikov**

*Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer  
Research Center, Russian Academy of Medical Sciences,  
Kashirskoye sh. 24, Moscow 115478; fax: (095) 324-1205,  
E-mail: mkras@mail.cnr.ru*

Submitted September 17, 1999

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) is one of the major cellular proteins mediating the activity of various signal transduction pathways. Double enzymatic activity of PI3K (phosphoinositide kinase and protein kinase activities) has been associated with the regulation of multiple cellular processes, including cell growth, aging, transformation and survival. PI3K has been implicated in the regulation of growth signal which occurs via the interaction with mitogenic proteins (protein kinase C, MAP kinases, small G-proteins, PDK). PI3K involvement into alternative cellular regulatory pathway – anti-apoptotic signal has been attributed to interaction between PI3K and protein kinase B (PKB) mediated by lipid products of PI3K. Recently PI3K was identified as one of the oncogenes which exerts its transforming effect through cellular regulatory proteins such as ras, src, rac, alb. From the other side, the transforming activity of some viral or cellular oncogenes (T-antigen, src, ras) depends on intracellular level of PI3K. In general, transforming activity of PI3K may be accompanied by a multiple alterations of signal transduction pathways including: PI3K-dependent stimulation of growth signal and activation of some protooncogenes, activation of PI3K/PKB anti-apoptotic pathway resulting in an increase of cell survival, actin reorganization.

**KEY WORDS:** phosphatidylinositol 3-kinase, phosphoinositides, MAP kinases, protein kinase B, proliferation, apoptosis, oncogenic transformation, aging.

УДК 576.385.5

## ВИРУС-АССОЦИИРОВАННЫЕ ОПУХОЛИ ЧЕЛОВЕКА: РАК ШЕЙКИ МАТКИ И ВИРУСЫ ПАПИЛЛОМ

### Обзор

© 2000 г. Ф.Л. Киселев

Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115478 Москва, Каширское ш., 24; факс: (7-095) 323-5733,  
электронная почта: f.kis@cityline.ru

Поступила в редакцию 17.09.99

Обобщены экспериментальные данные об этиологической роли вирусов в возникновении некоторых опухолей человека. Это вирусы Т-клеточного лейкоза взрослых (HTLV I), вирусы группы герпеса (HHV 8 и вирус Эпштейна-Барр), вирус гепатита В и вирусы папиллом. Характерной особенностью этих опухолевых заболеваний является длительный латентный период, от момента инфекции до проявления заболевания составляющий от 10 до 40 лет. Механизм опухолевой конверсии под действием вирусов специфичен для каждого типа вируса, но, как правило, он связан с нарушением функций клеточных генов, участвующих в процессах деления и пролиферации клеток. Это может быть прямая инактивация генов-супрессоров в результате взаимодействия с продуктами вирусных генов, как это имеет место в случае вирусов папиллом, или в результате трансактивирующего действия вирусных генов на клеточные гены, модулирующие пролиферацию клеток, как это имеет место в случае вируса гепатита В и HTLV I. Вирус является иницирующим фактором и для полного проявления онкогенного потенциала вирусных генов необходимы дополнительные генетические изменения в геноме инфицированной клетки, приводящие к формированию моноклональной популяции клеток с неконтролируемой пролиферацией. Разработаны подходы к созданию вакцин против тех форм рака, где этиологическая роль вирусов гепатита В и папиллом является доказанной (рак печени и рак шейки матки соответственно). Эти вакцины оказались эффективными в профилактике заболеваний (подтверждено на экспериментальных моделях) и в настоящее время начинают использоваться для вакцинации людей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** опухоли, рак шейки матки, трансформация, механизмы, вирусы папиллом, трансформирующие гены, онкогены, гены-супрессоры.

Общеизвестно, что жизнедеятельность клеток протекает под контролем собственных генов и четко регламентирована. Большинство клеток организма, как и клеток культивируемых *in vitro*, имеет ограниченный срок жизни и гибель клеток заранее программируема. Опухолевая клетка отличается от нормальной прежде всего и главным образом тем, что она выходит из-под контроля и вместо апоптотической гибели продолжает бесконтрольно делиться и, как следствие этого, возникает опухоль. Таким образом, в опухолевых клетках происходит переключение одной генетической программы (апоптоз) на принципиально иную, при которой клетки становятся бессмертными. Для многих спонтанных опухолей имеются серьезные доказательства вовлеченности определенных клеточных генов и прежде всего онкогенов, генов-супрессоров и генов-регуляторов клеточного цикла в этот процесс, но для подавляющего большинства опухолей молекулярные механизмы запуска «онкогенной» программы клетки остаются неизвестными.

Опухоли, индуцированные вирусами, в значительной степени восполняют этот пробел, поскольку позволяют с достаточно высокой долей вероятности идентифицировать вирусный ген, стимулирующий процесс бесконтрольной пролиферации клеток, и проследить пути передачи этого сигнала в клетке.

Именно поэтому вопрос о роли вирусов в канцерогенезе представляется одним из наиболее интересных не только для онкологии, но и для биологии в целом. Опухоли, у которых вирусы идентифицированы в качестве этиологических факторов, обнаружены у многих видов млекопитающих и птиц. Они способны вызывать трансформацию клеток *in vitro* и индуцировать опухоли *in vivo*. В составе этих вирусов идентифицированы либо специальные гены (онкогены), продукты которых непосредственно контролируют трансформированный фенотип зараженных клеток, либо гены, продукты которых индуцируют синтез других генов, участвующих в контроле пролиферации клеток. Оба типа вирусов представляют собой прекрасную модель

для изучения изменений в биологическом поведении клеток в результате взаимодействия различных типов генов.

Хотя, как уже указывалось выше, вирусы, обладающие онкогенным потенциалом, были выделены у многих животных и птиц, человек представлял в этом плане исключение в течение достаточно длительного периода времени, так как многочисленные попытки выделения такого вируса при различных опухолях человека заканчивались безрезультатно. Определенный прорыв наметился в начале 80-х годов, когда были выделены как ДНК-, так и РНК-содержащие вирусы, которые по многим критериям можно было охарактеризовать как этиологический фактор данного опухолевого процесса [1]. К настоящему времени известно несколько таких вирусов, которые ответственны за возникновение ~15% всех опухолей человека. К их числу следует отнести вирусы прямого действия – вирусы папиллом, которые являются этиологическим фактором опухоли шейки матки и содержат собственные трансформирующие гены, два других типа ДНК-содержащих вирусов – вирус гепатита В, ассоциированный с опухолями печени, и два герпес-вируса – Эпштейна-Барр, ассоциированные с раком носоглотки и лимфомой Беркитта, и вирус герпеса типа 8, связанный с саркомой Капоши. Вирус гепатита В относится к числу вирусов непрямого действия, поскольку не содержит в своем составе онкогена, а онкогенный потенциал проявляет путем активации клеточных генов, участвующих в процессах пролиферации. Что касается обоих герпес-вирусов, то их структура настолько сложна, что все имеющиеся экспериментальные данные об онкогенном потенциале отдельных участков генома этих вирусов носят пока еще предварительный характер.

Идентифицирован также один РНК-содержащий ретровирус – вирус Т-клеточного лейкоза взрослых (HTLV I), который охарактеризован как этиологический фактор у больных со сравнительно редким и эндемичным видом лейкоза (Т-клеточный лейкоз взрослых – ATL). Этот вирус также не имеет собственного онкогена, но содержит ген, который кодирует несколько белков, способных активировать различные факторы, в том числе цитокины, стимулирующие клетки к активной пролиферации.

По-видимому, одна общая и характерная особенность всех вирус-ассоциированных опухолей человека состоит в том, что опухоли у таких больных возникают после длительного латентного периода – от 5 до 30 и более лет. Это свидетельствует о том, что даже в вирусных опухолях необходимо несколько генетических со-

бытий для полного проявления онкогенного потенциала вирусных генов. Эти вторичные генетические процессы только начинают изучаться и механизмы их действия практически не изучены.

Вирус-ассоциированные раки человека, по-видимому, оказались теми формами рака, при которых весьма эффективной формой профилактики может оказаться вакцинация, поскольку создание противовирусных вакцин должно быть эффективным средством для предотвращения первичной вирусной инфекции.

Из изложенного выше становится очевидным, что онковирусология человека представляет собой стремительно развивающуюся область онкологии, которая может дать серьезные практические выводы.

Обобщить все имеющиеся экспериментальные данные в этой области в одном обзоре вряд ли представляется возможным. В силу этого мы решили сосредоточить внимание читателей на одной модели, где получены наиболее впечатляющие данные, касающиеся как механизмов индукции опухолевого статуса клеток под действием вирусных генов, так и по созданию противоопухолевых вакцин. Такой моделью являются опухоли шейки матки и обнаруженные в этих опухолях вирусы папиллом человека. Каждый год этой формой рака по всему миру заболевает 400 000 женщин и по частоте встречаемости он занимает второе место у женщин после рака молочных желез [1].

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМ

После того как в середине 70-х годов было высказано предположение [2], что вирусы папиллом человека (HPV), по-видимому, являются этиологическим агентом рака шейки, эта область вирусологии и онкологии получила стремительное развитие. С одной стороны, это привело к твердым доказательствам этиологической роли HPV при данной форме рака, что окончательно подтверждено в пресс-релизе Всемирной организации здравоохранения от 3 июля 1996 г., с другой – способствовало стремительному прогрессу в анализе не только вирусов этой группы, но и в изучении механизмов превращения нормальной клетки в опухолевую под действием вирусов.

В настоящем обзоре мы не ставили своей задачей представление всех данных по доказательству роли HPV при раке шейки матки (частота встречаемости вирусной ДНК в опухолях, экспрессия этой ДНК, форма ее персистенности, эпидемиологические данные, об этом подробно



см. [3]), а хотели бы акцентировать внимание на тех вирусных генах, которые играют ключевую роль в процессах злокачественной трансформации клеток.

В настоящее время известно более 100 типов HPV человека [3]. Характерной особенностью вирусов этой группы является отсутствие адекватной чувствительной клеточной модели для размножения, поэтому практически все типы HPV идентифицированы на основании выявления в зараженных клетках вирусной ДНК, последующего ее клонирования и секвенирования. Фактически все HPV можно условно разделить на две большие группы, которые ассоциируются либо с кожей, либо со слизистыми оболочками. Наиболее типичными проявлениями инфекции кожи являются доброкачественные бородавки, а слизистых – предраковые и раковые поражения шейки матки [4].

Все вирусы папиллом имеют сходную структуру. Они содержат ДНК в 8000 пар оснований (п.о.), составляющих девять открытых рамок считывания, причем две из них (L1 и L2) кодируют структурные белки вириона, остальные семь (E1–E7) относятся к так называемым «ранним» вирусным генам и контролируют функции, необходимые для репродукции и проявления патогенного потенциала [5].

Среди всех известных HPV лишь сравнительно небольшое количество ассоциировано с различными злокачественными поражениями. Среди «кожных» вариантов HPV к числу таких относятся обнаруженные при бородавчатой эпидермодисплазии – заболевании, при котором плоскоклеточные карциномы возникают из папиллом в результате солнечного облучения [6]. Наиболее часто при этом заболевании выявляются HPV типа 5, а существенно реже HPV других типов (8, 14, 17, 20) [7]. Но поскольку отсутствуют какие-либо клеточные модели этого заболевания, о механизмах функционирования вирусных генов практически ничего неизвестно.

Наиболее серьезные данные о связи HPV с канцерогенезом у человека получены на модели HPV, выявляемых в слизистых оболочках и прежде всего рака шейки матки. Пионерские исследования группы Х.цур Хаузена [8–11] в середине 80-х годов убедительно показали, что как минимум два типа HPV (16 и 18) выявляются при раках шейки матки, в то время как при доброкачественных поражениях в основном были обнаружены HPV, типы 6 и 11. В дальнейших исследованиях еще несколько типов HPV было обнаружено как при раках шейки матки, так и при других злокачественных поражениях аногенитальной области у женщин и мужчин (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 70). В то же время ко-

личество новых типов HPV, выделенных из папиллом (доброкачественных поражений) этой области и папиллом полости рта, было существенно меньше (типы 3, 32, 72, 73) [12].

При использовании соответствующих чувствительных методов ДНК HPV различных типов выявляются более, чем в 90% опухолей шейки матки, что является важным аргументом в пользу того, что присутствие вирусного генетического материала является необходимым фактором для превращения нормальных клеток в опухолевые.

На основании изложенных выше данных все HPV, выделенные при доброкачественных и злокачественных неоплазиях, были разделены на так называемые HPV «низкого» и «высокого» риска. Анализ этих двух классов HPV не выявил принципиальных структурных различий в генетической структуре – и те и другие содержат по два структурных гена (L1 и L2) и семь функциональных генов (E1–E7). Кроме того, в составе всех HPV была идентифицирована регуляторная область (URR – upstream regulatory region), локализуемая непосредственно перед генами E6 и E7. В составе URR было идентифицировано значительное количество сайтов, способных взаимодействовать как с позитивными, так и негативными факторами транскрипции (см. ниже). Необходимость такого взаимодействия очевидна, если исходить из того, что инфекция HPV для плоскоклеточного и слизистого эпителия является персистентной и вызывает ускоренную пролиферацию зараженных клеток. Для достижения эффективной инфекции вирус должен проникнуть в базальные клетки, поскольку только эта группа клеток в эпителии способна к размножению. Эти клетки продуцируют все остальные клетки лежащих выше слоев, которые в процессе дифференцировки теряют способность к размножению и отслаиваются от поверхности. Репликация вирусной ДНК, экспрессия поздних генов и сборка вирионов тесно связаны со стадией дифференцировки и происходят только в верхележащих клеточных слоях эпителия.

На разных стадиях инфекции после миграции вирусной ДНК в клеточное ядро транскрипция разных генов HPV зависит главным образом от клеточных транскрипционных факторов. На более поздних стадиях в регуляции экспрессии как ранних, так и поздних вирусных функций принимают участие и вирусные факторы.

Одна из характерных особенностей HPV инфекции шейки матки состоит в том, что вирусные последовательности выявлены не только в злокачественных опухолях – карциномах, но и в предраковых поражениях (так называемой «интраэпителиальной дисплазии» (CIN)) разного уровня, что может свидетельствовать о том, что

вирус действительно является иницирующим фактором, а в прогрессии опухолевого процесса важная роль принадлежит клеточным генетическим факторам.

Вирусный геном в зараженных клетках может персистировать как в эпизомальной, так и в интегрированной формах [13]. Первые данные свидетельствовали о том, что на ранних стадиях опухолевого процесса (CIN) эпизомальная форма является преобладающей, в то время как в карциномах вирусная ДНК интегрирована в клеточный геном [14]. Однако в настоящее время столь однозначная трактовка этих результатов вряд ли справедлива. По-видимому, в опухолевых линиях, полученных из карцином шейки матки, в подавляющем большинстве случаев вирусная ДНК интегрирована в клеточный геном, в то время как в опухолях (для которых характерна гетерогенность клеточной популяции) возможно выявление обеих типов персистенции вирусной ДНК [15]. В какой степени интеграция является определяющим фактором для поддержания опухолевого статуса клетки, остается неясным, поскольку отсутствует полная информация о том, какие типы РНК считаются с интегрированным и эпизомальным вирусным геномом.

### РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ВИРУСНЫХ ГЕНОВ

Из представленных выше данных с очевидностью следует, что поддержание трансформированного фенотипа контролируется функционированием вирусных генов. В настоящее время можно считать установленным, что основными трансформирующими генами вирусов папиллом человека являются гены E6 и E7, экспрессия которых модулируется областью URR, размер которой колеблется от 800 до 1000 п.о. для HPV различных типов. Эта область может быть разделена на три участка – 5'-область, центральный сегмент и 3'-область, которая расположена непосредственно перед генами E6 и E7. За этими генами локализуются гены E1 и E2, причем последний перекрывает ген E4, и ген E5, который также, возможно, является трансформирующим геном. Сигнальная терминирующая последовательность для поли(А) локализуется на 3'-конце ранней области. Транскрипция РНК начинается с промотора в 3'-области URR непосредственно перед началом гена E6. Этот промотор обозначен P97 для HPV16 и P105 для HPV18. Промотор содержит ТАТА-бокс и сайт инициации транскрипции, которые регулируются различными онкогенными элементами, локализованными в центральном и 3'-сегментах URR. Именно они и

узнаются клеточными факторами. 3'-Область URR содержит также два сайта для вирусного транскрипционного фактора E2, сайты связывания для клеточных транскрипционных факторов Sp1 и YY1 и ориджина репликации с сайтом связывания для вирусного белка E1.

Центральный сегмент URR содержит конститутивный энхансер, наиболее активный в эпителиальных клетках и зависящий только от клеточных факторов [16–19]. В этом участке идентифицированы сайты связывания для различных клеточных факторов, включая AP1, NF1, Oct1, TEF1, TEF2, YY1, и рецепторы стероидных гормонов. Все эти факторы являются убиквитарными и могут функционировать в клетках различных типов. 5'-Участок URR содержит сигналы для терминации и полиаденилирования поздних вирусных транскриптов [18].

Среди многочисленных факторов, способных взаимодействовать с участком URR, имеется лишь один фактор вирусной природы (E2), активность которого может иметь существенное значение для функционирования трансформирующих генов HPV.

URR HPV содержит четыре E2-связывающих сайта. Данные по действию E2 на транскрипцию генов E6 и E7 носят противоречивый характер. С одной стороны, белки-продукты гена E2 могут функционировать в качестве репрессоров для промотора HPV типа 18 [20], а мутации по гену E2 увеличивают уровень имortalизации клеток под действием генов E6 и E7 [21]. С другой стороны, имеются данные о том, что E2-белки HPV16 и HPV18 активируют промотор в URR [22]. По-видимому эти различия обусловлены синтезом неодинаково сплайсированных мРНК данного гена, приводящих к образованию белков E2 меньшего размера. Именно белок E2, утратившей N-концевой трансактивирующий домен, может интерферировать с активирующими возможностями полноразмерного белка E2 [22]. Таким образом, регуляция активности генов E6 и E7 под действием продукта вирусного гена E2 является достаточно сложной, так как этот белок обладает двойной функцией – активатора и репрессора.

Среди многочисленных клеточных факторов, способных взаимодействовать с участком URR, отметим лишь те из них, значимость которых для проявления функций генов E6 и E7 представляется очевидной. Это прежде всего фактор AP1, представляющий собой димерный белковый комплекс, содержащий по одному из представителей двух семейств генов *jun* и *fos*. URR HPV16 и HPV18 содержат соответственно три и два AP1-связывающих сайта. По-видимому, основная функция AP1 – участие в определении

специфичности транскрипта и уровня дифференцировки на транскрипционную активность URR [23]. Другим важным регулятором URR является фактор YY1, причем в данной системе он может функционировать и как активатор, и как репрессор транскрипции в зависимости от типа вируса, типа клеток и активности других транскрипционных факторов и прежде всего фактора AP1 [24, 25]. Еще одна группа сайтов способна связывать C/EBP (ССААТ – энхансер-связующий белок) [26], причем факторы этого типа могут взаимодействовать не только непосредственно с соответствующей областью ДНК в участке URR, но и образовывать комплексы с другими клеточными факторами. Основная функция этой группы генов – регуляция клеточной дифференцировки и активация генов различных цитокинов. Фактор SP1 способен связываться с элементом GC-боксов и его сайт находится непосредственно рядом с TATA-боксом. Этот фактор необходим для транскрипции вирусного генома [27].

Среди транскрипционных факторов, принадлежащих к группе ядерных рецепторов, две группы (рецепторы стероидных гормонов и тироид-ретиноидные) имеют рецепторы в URR-области. Среди рецепторов стероидных гормонов – глюкокортикоидные и прогестероновые [28–30]. Сайт, отвечающий на глюкокортикоид (GRE), локализуется в 3'-области между AP1- и Sp1-связывающими сайтами. Оба типа рецепторов являются активаторами транскрипции. Фактор, специфический для кератиноцитов KRF1, способен взаимодействовать с AP1 для активации транскрипции [31].

URR содержит также несколько связующих сайтов для белков с так называемым «POU-доменом», которые способны связываться с канонической октамерной последовательностью ATGCAAAT (тогда эти белки обозначаются как Oct). Один из белков этой группы (Oct1) репрессирует URR HPV18 [32], а другой представитель этого семейства (Eos1) обладает обратным эффектом [33]. Для факторов семейства NF1 имеется несколько сайтов связывания в области конститутивного репрессора [34]. Эти сайты обладают сравнительно низким аффинитетом и, по-видимому, являются необходимыми для проявления специфичности транскрипции в эпителиальных клетках. Транскрипционные факторы TEF1 и TEF2 имеют четыре сайта в энхансере HPV16 и они, по-видимому, являются активаторами для промотора P97 [35].

Таким образом, представленная выше краткая сводка по факторам, регулирующим транскрипцию трансформирующих генов HPV, свидетельствует о том, что этот контроль носит

сложный характер, поскольку осуществляется многочисленными транскрипционными факторами, обладающими позитивным и негативным эффектами. Они способны взаимодействовать как непосредственно с областью URR вирусного генома, так и друг с другом.

## ТРАНСФОРМИРУЮЩИЕ ГЕНЫ ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМ

Ген E6. Из представленных выше данных следует, что в злокачественных опухолях вирусный геном персистирует, как правило, в интегрированной форме, причем разрыв в вирусном геноме, необходимый для встраивания в клеточный, происходит в основном в рамках E1–E2. Из этого следует, что в трансформированных клетках интактными могут оставаться гены E6 и E7, экспрессия которых контролируется областью URR. Три доказательства свидетельствуют в пользу того, что именно эти гены контролируют трансформированный фенотип клеток: 1) гены E6 и E7 обладают трансформирующим потенциалом *in vitro*, 2) трансфицированные этими генами клетки способны индуцировать опухоли у бестимусных мышей, 3) ингибирование экспрессии генов E6/E7 вызывает в клетках реверсию трансформированного фенотипа.

Ниже будут представлены данные о трансформирующем потенциале этих генов.

Гены E6 и E7 транскрибируются с промоторов p97 (для HPV16) или p105 (для HPV18) как полицистронные мРНК [36]. Идентифицированы пять различных типов мРНК, содержащих рамку E6, но только одна из них является полноразмерной. Четыре остальных вида являются укороченными и возникают в результате дифференциального сплайсинга либо внутри рамки E6, либо между рамкой E6 и рамками E1 или E2, последовательности которых выявляются в этих сплайсированных РНК. Наиболее часто встречаемой является РНК, содержащая урезанный вариант гена E6 (обозначаемый E6\*) и полноразмерный ген E7 [37, 38]. Функции такой РНК остаются неясными.

Продукт гена E6 – белок, содержащий 150 аминокислот, в котором отсутствуют какие-либо ферментативные активности. Локализуются белки E6 в ядре, цитоплазме и мембранной фракции [39]. Белки достаточно консервативны и E6 HPV группы «низкого риска» гомологичны между собой на 80–90%, примерно сходные уровни гомологичности наблюдаются и у HPV группы «высокого риска». Между собой E6 этих двух групп сходны на 50–60%. Характерной особенностью белков E6 всех HPV является нали-

чие четырех последовательностей типа «цинковых пальцев» [40], т.е. последовательностей, характерных для белков, способных взаимодействовать с ДНК, однако все попытки выявить такое взаимодействие закончились неудачно.

Исследование биологической активности гена Е6 HPV высокого риска показало, что он как в одиночестве, так и в сочетании с геном Е7 способен к иммортализации эпителиальных клеток человека [41], а в отсутствие Е7 – к интерференции с дифференцировкой кератиноцитов, индуцируемой сывороткой и ионами  $\text{Ca}^{2+}$  [42]. Кроме того, ген Е6 способен к иммортализации эпителия молочных желез человека [43], в кооперации с активированным онкогеном *ras* – к иммортализации фибробластов грызунов [44], а в сочетании с геном Е7 – к образованию опухолей у трансгенных мышей [45].

В отличие от Е6 HPV высокого риска Е6 HPV низкого риска не способны ни к иммортализации, ни к трансформации [46].

Одной из главных мишеней действия гена Е6 является продукт гена р53. Как известно, ген р53 [47] является модулятором транскрипции и специфически взаимодействует с ДНК, трансактивируя при этом такие важные гены, как  $\text{p21}^{\text{WAF1}}$ , который является ингибитором циклинзависимых киназ [48], и *bax*, участвующий в апоптозе клеток [49]. Этот ген активируется при обработке клеток ДНК-повреждающими агентами и в условиях гипоксии [50, 51]. Мутантный вариант гена р53, регулярно выявляемый во многих опухолях, не способен к осуществлению функций, описанных выше, и, кроме того, в некоторых опухолях его локализация ограничена цитоплазмой [52].

Ранее было показано, что белок гена р53 способен копреципитироваться с большим Т-антигеном вируса SV40 и продуктом раннего гена Е1а аденовируса из клеток, зараженных этими вирусами [53, 54]. На основании этого было высказано предположение о роли р53 в проявлении онкогенного потенциала данных вирусов. Оказалось, что белок Е6 HPV высокого риска (но не низкого риска) также способен взаимодействовать с р53 в системах *in vitro* [55]. Однако, по-видимому, биологический смысл взаимодействия вирусных генов с р53 в этих трех системах различен, поскольку для первых двух образование комплекса способствует стабилизации белка р53, а в системе с геном Е6 HPV, тип 16, период полужизни р53, наоборот, уменьшается. Это связано с тем, что происходит деградация белка р53 за счет системы убиквитина [56], которая является основным фактором деградации цитозольных и ядерных белков в клетках эукариот [57]. Для деградации р53 под действием Е6

необходимо предварительное образование комплекса между Е6 и одним из компонентов этого комплекса – убиквитин-протеинлигазой, обозначаемой Е6-АР и имеющей молекулярную массу 105 кДа [58].

Кроме того, что взаимодействие р53 с белком Е6 HPV вызывает деградацию р53, Е6 ингибирует такие функции дикого типа р53, как транскрипционная активация и транскрипционная репрессия, т.е. конкурирует за те функции, которые являются определяющими в выполнении р53 супрессорных функций в опухолевом росте. В дополнение к этому показано, что Е6 увеличивает уровень мутагенеза и генетической нестабильности [59]. Поскольку в подавляющем большинстве карцином шейки матки (в отличие от многих других опухолей человека) отсутствуют мутации в гене р53 [60], можно предполагать, что экспрессия белка Е6 HPV высокого риска в итоге оказывает на р53 такое же воздействие, как и соматические мутации, т.е. потерю р53 регулируемой транскрипции и ингибирование нормального клеточного ответа на повреждение ДНК.

Белок р53 обладает еще рядом свойств, которые могут вносить вклад в процесс трансформации и независимы от р53. К их числу относятся активация гетерологичных промоторов [61], уменьшение апоптоза [62], активация теломеразы, ферментативного РНК-белкового комплекса, поддерживающего размер теломерной области хромосом [63], связывание с  $\text{Ca}^{2+}$  связывающим белком Е6BP, идентичным белку ERC 55 [64], взаимодействие с малоизученной протеинкиназой и ее субстратом [65], трансактивации промоторов  $\alpha$ -протимозина и с-туса [66]. Функциональная значимость этих взаимодействий остается пока неясной.

Ген Е7. Продуктом гена Е7 является сравнительно небольшой фосфобелок, содержащий 98 аминокислот. N-Концевой домен этого белка (аминокислоты 1–38) содержит в основном гидрофильные аминокислоты, в то время как С-концевой домен (аминокислоты 39–98) более гидрофобен. Несмотря на расчетную молекулярную массу (11 кДа) белок Е7 HPV16 мигрирует при электрофорезе в полиакриламидном геле как молекула с массой 18–20 кДа [67]. Е7 структурно и функционально родственен белкам других ДНК-содержащих вирусов, таких как второй Т-антиген вируса SV40 и ранний белок Е1А аденовируса. Белок Е7 может быть разделен на три основных домена – консервативный участок 1 (CR1), консервативный участок 2 (CR2) и консервативный участок 3 (CR3). Все три домена необходимы для проявления биологической активности Е7 [68].

Участок CR1 состоит из короткой последовательности аминокислот (6–15), которая является высококонсервативной и сходной с таковой в CR1 E1A аденовируса. Несмотря на это, существует функциональное различие между CR1 у белков этих вирусов – CR1 E1A способен взаимодействовать с такими «rocket» белками, как p300, и с меньшей эффективностью с pRb, в то время как CR1 E7 не способен взаимодействовать с белком p300 [69]. Делеции или точечные мутации в CR1 E7 HPV16 приводят к резкому снижению трансформирующего потенциала этого гена [70]. Участок CR2 HPV16 E7 содержит домен LXCXE (аминокислоты 22–26), который отвечает за взаимодействие с rocket-белками (белок p105 гена супрессора pRb и родственные белки p107 и p130). Любые мутации в этой области элиминируют способность взаимодействовать с pRb и подавляют трансформирующую активность E7 [71]. HPV низкого риска имеют одно характерное отличие – в CR2-домене вместо аспарагиновой кислоты в позиции 21 у E7 HPV16 в HPV 6 и HPV11 в той же позиций находится глицин. По-видимому, именно эта замена обеспечивает E7 HPV высокого риска более высокое сродство с pRb и способность к кооперации с активированными онкогенами *gas* при трансформации первичных клеток грызунов [72]. Кроме главного сайта связывания с pRb в CR2, возможно, существует еще один сайт в домене CR3, участвующий в ассоциации с pRb [73].

С-Концевая область домена CR2 содержит сайт для казеинкиназы II (СК II) (сериновые остатки в позициях 31 и 32). Именно эти два аминокислотных остатка фосфорилируются *in vitro* СК II. Биологический смысл фосфорилирования остается неясным, но не исключено, что этот сайт каким-то образом вовлечен в трансформацию. Замена указанных двух сериновых остатков незаряженными остатками аланина снижает способность E7 к котрансформации первичных клеток с *gas*, в то время как замена на негативно заряженный остаток аспарагиновой кислоты приводит к формированию фенотипа дикого типа [74]. Кроме того, фосфорилирование этих двух сериновых остатков резко усиливает взаимодействие белка E7 HPV16 с TATA-боксом связующим белком TBP [75].

Домен CR3 HPV16 E7 имеет очень слабую гомологию с CR3-доменом белка E1A аденовируса, но оба домена содержат две CXXC-последовательности, участвующие в связывании с  $Zn^{2+}$  [76]. Последовательности CR3 E7 существенно отличаются от таковых у белков, содержащих «цинковые пальцы». Связывание E7 с Zn приводит к димеризации белка E7 и, по-видимому, димеризация является важным моментом в проявлении трансформирующей активности E7 [77].

Что касается локализации E7, то первоначально были получены противоречивые результаты, по-видимому обусловленные тем, что этот белок маскирован в клетках и далеко не все его эпитопы доступны используемым антителам. Совокупность имеющихся данных позволяет считать, что E7 локализуется в нескольких клеточных фракциях – главным образом в ядре и ядрышке [78, 79].

Иммортализирующие и трансформирующие возможности E7 HPV высокого риска зависят от типа используемых для этой цели клеток. E7 HPV16 и HPV18 способны индуцировать образование фокусов трансформации и рост в полужидком агаре в различных стабильных клеточных линиях фибробластов грызунов, таких, к примеру, как NIH3T3 и Y31 [80, 81], для E7 HPV низкого риска наблюдается меньшая эффективность трансформации: клетки не способны к росту в полужидком агаре, но являются опухоленными для бестимусных мышей [82].

E7 белки HPV16 или HPV18 сами по себе способны к иммортализации первичных клеток грызунов [83], а в сочетании с активированным *gas* – их трансформации [84]. В системе кератиноцитов человека ген E7 вызывает иммортализацию, эффективность которой существенно возрастает при котрансфекции с геном E6 HPV высокого риска. В некоторых случаях такая котрансфекция может приводить и к трансформации [85]. Кроме того, ген E7 может вызывать иммортализацию еще нескольких типов клеток, таких как эпителиальные клетки молочных желез, клетки поверхностного эпителия яичника [86, 87]. E7 и E6 гены HPV низкого риска не способны к иммортализации первичных кератиноцитов [88].

Основная функция гена E7 HPV высокого риска сводится к дерегулирующему эффекту на прохождение клеточного цикла и в основном индуцирует переход покоящихся клеток из G0- в S-фазу. Это осуществляется за счет активации некоторых клеточных генов под влиянием E7 и в результате прямого взаимодействия E7 с белками, регулирующими прохождение клеточного цикла.

В клеточном цикле можно выделить два основных этапа – репликацию генома и последующую редупликацию клеток. Эти два события разделены двумя фазами – G1 до репликации ДНК, и G2 – до митоза. Правильность прохождения цикла контролируется циклинзависимыми протеинкиназами (CDK). В нормальных клетках переход из G0-фазы запускается факторами роста и рецепторами этих факторов, специфичными для данного типа клеток. На этом этапе ростовые факторы активируют экспрессию цик-



линов D-типа и ассоциированных с ними киназ (CDK4 или CDK6), индуцируя переход клеток в G1-фазу. Это сопровождается в свою очередь активацией циклинов E и A и фактора транскрипции E2F-1. Белки семейства гена ретинобластомы (pocket-белки – pRb, p107, p130) блокируют прогрессию клеточного цикла путем взаимодействия с клеточными транскрипционными факторами семейства E2F и DP. Pocket-белки инактивируются в результате фосфорилирования по многим сайтам под действием CDK, что приводит к образованию транскрипционно активных гетеродимеров E2F/DP. Такие ингибиторы CDK, как p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>WAF1</sup> и p27<sup>KIP1</sup>, задерживают клетки в G1-фазе путем ограничения фосфорилирования pRb и родственных белков [89].

Ген E7 HPV16 обеспечивает переход клеток из G1- в S-фазу клеточного цикла и увеличивает пролиферативную активность первичных кератиноцитов и эпителиальных клеток молочных желез человека. Ген E7 способен преодолевать контроль за прохождением клеточного цикла на границе G1/S, что позволяет предполагать, что E7 способен либо нейтрализовать, либо преодолевать блокирующий эффект физиологических ингибиторов CDK, таких как p21<sup>WAF1</sup> и p27<sup>KIP1</sup>, которые индуцируются p53 и удалением сыворотки [90].

Ген E7 HPV16 способен взаимодействовать с белком гена-супрессора pRb105, что приводит к возрастанию деградации pRb [91]. Это сопровождается индукцией активности семейства клеточных транскрипционных факторов, состоящих из множественных E2F/DP-гетеродимеров. E7 и E2F-1 связываются с различными сайтами на pRb [92]. С участком CR2 на E7 связывается также pRb – родственный белок p107 [93]. На разных фазах клеточного цикла существуют два различных комплекса E2F–p107, но E7 селективно разрушает комплекс, специфичный для G1-фазы [94].

Среди генов, которые активируются в результате освобождения E2F, идентифицирован ген E2 аденовируса типа 5, а также гены, кодирующие B-myb, циклины A и E [95–97].

Кроме pRb и родственных ему белков, связанных с регуляцией клеточного цикла, существуют и другие белки-регуляторы транскрипции, являющиеся мишенями для E7. Сюда относится семейство транскрипционных факторов AP-1. В результате взаимодействия AP-1 с E7 происходит трансактивация AP-1-направляемых генов [98]. Кроме того, E7 HPV16 способен связываться с ТАТА-бокс-связующим белком и TBP – ассоциированным фактором TAF110 [99].

Доказана возможность физического взаимодействия E7 HPV16 с циклином A и CDK2 через CR2-домен [100], а также с циклином E в комплексе с CDK2 и p107 [101]. Не исключено, что

взаимодействие E7 с циклинами опосредовано p107, который, как было указано выше, способен ассоциироваться с циклинами A и E [102]. Ингибитор CDK p27<sup>KIP1</sup> связывается с E7 через C-концевой домен, что приводит к функциональной инактивации p27<sup>KIP1</sup> [103].

Характерной особенностью гена E7 HPV16 является его способность как к пролиферации, так и к апоптозу. Последний феномен четко проявляется в нормальных фибробластах человека в отсутствие активности гена E6 [104]. Ответственным за проявление этой активности является pRb-связывающий домен E7. Характерно, что апоптоз под действием E7 проявляется в клетках мышей с удаленным геном p53. Таким образом, апоптоз под действием E7 может проявляться по p53-зависимому и p53-независимому путям [53].

**Функциональная кооперация онкобелков E6 и E7.** Как видно из представленных выше данных, онкобелки E6 и E7 обладают онкогенным потенциалом *per se*, но этот потенциал существенно возрастает при совместной экспрессии [41, 85]. Это свидетельствует о том, что вирусные гены могут функционально кооперировать в процессе клеточной трансформации. По-видимому, наиболее интересный аспект этой проблемы состоит в том, что E6 может потенцировать нарушение контроля за регуляцией размножения путем ингибирования апоптоза, направляемого E7. Это нашло экспериментальное подтверждение на модели трансгенных мышей [105], а также в уроэпителиальных клетках человека [106]. Таким образом, функциональная кооперация между белками E6 и E7 HPV высокого риска в процессе трансформации хотя бы частично может быть связана с E6-индуцированным ингибированием апоптоза, что сопровождается элиминацией клеток с нарушенной системой ростовых сигналов, включая и те, которые направляются E7.

Функции E6 и E7 также тесно связаны и на уровне дерегуляции клеточного цикла и размножения клеток. По этой схеме pRb является общей мишенью для обоих вирусных белков в результате физического взаимодействия с E7 и изменения уровня фосфорилирования под действием E6. По этому сценарию E6 подавляет активацию p21<sup>WAF1</sup> (ингибитор циклинзависимых киназ), опосредованную p53 [48]. Индукция p21<sup>WAF1</sup> под действием p53 контролирует нефосфорилированный статус pRb, который является необходимым для функционирования pRb как контролирующего фактора в G1-фазе клеточного цикла [107]. Ингибирование индукции p21<sup>WAF1</sup> (опосредованное p53) под действием p53 может приводить к нарушениям в контролирующих функциях pRb и, таким образом, кооперировать в инактивации pRb при связывании с E7.

Таким образом, механизм проявления трансформирующего потенциала вирусов папиллом представляется более или менее понятным. Вирус содержит два трансформирующих гена, экспрессия которых в зараженных клетках контролируется клеточными факторами, продукты которых тем или иным способом нарушают функции генов, играющих ключевую роль в клеточном цикле и пролиферации.

Этот механизм объясняет те процессы, которые происходят в клетках *in vitro*, но вряд ли может полностью прояснить ситуацию, которая имеет место при возникновении опухолей в организме. Почему в этом случае требуется длительный латентный период, имеются ли какие-либо особенности в ДНК из опухолей по сравнению с ДНК из клеток, трансформированных *in vitro*? Прямых ответов на эти вопросы нет, но в последнее время появляется все большее количество данных о том, что кроме первичных генетических изменений, индуцируемых присутствием вирусного генома, в клетках происходит накопление дополнительных мутаций (вторичных генетических изменений), совокупность которых может приводить к селекции клона клеток и появлению моноклональной популяции, размножение которой уже не может сдерживаться никакими негативными факторами. Анализ микросателлитных последовательностей на отдельных хромосомах (потеря ими гетерозиготности – ЛОН и наличие нестабильности в этих повторяющихся последовательностях) позволил получить дополнительную информацию о существенных нарушениях в хромосомах в опухолях шейки матки, несущих геном вирусов папиллом.

### ВТОРИЧНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОПУХОЛЯХ ШЕЙКИ МАТКИ

Анализ ДНК из опухолей шейки матки на наличие ЛОН с помощью амплификации микросателлитных последовательностей позволил получить серьезные доказательства нестабильности генома опухолевых клеток. Следует подчеркнуть, что выявление ЛОН является одним из индикаторов присутствия в данном участке хромосомы предполагаемого гена-супрессора.

Наличие ЛОН было выявлено более чем в 20% опухолей для хромосом 1, 3, 4, 5, 6, 11, 18 и 20, что свидетельствовало о том, что вторичные генетические изменения могут проявляться на многих хромосомах [108], причем наибольшая частота ЛОН была обнаружена на хромосомах 6p, 3p и 18 (43, 39 и 35% соответственно) [109]. Более поздние исследования выявили ЛОН так-

же на хромосомах 4p, 6q, 15q, 18q и Xq [110]. На хромосоме 3 выявлено как минимум четыре независимых района, три из которых картируются на коротком плече этой хромосомы, где, в частности, локализован ген FHIT, один из возможных генов-супрессоров [111]. Аллельные потери имеются и на длинном плече хромосомы 3, что позволяет предполагать наличие и других генов-супрессоров [112]. ЛОН выявлена на хромосоме 3 при раках шейки матки и в участке, где картирован ген  $\beta$ -катенина, являющийся ключевым компонентом межклеточных контактов [113]. Не исключено, что частота ЛОН на хромосоме 3 коррелирует с прогрессией заболевания [114].

На каждом из плеч хромосомы 4 выявлено по одному независимому району локализации возможных генов-супрессоров [115], а на хромосоме 5 – один такой локус в прителомерной области короткого плеча [116].

Существенная генетическая нестабильность выявлена на хромосоме 6 [108, 109, 117–119], причем наибольшая частота ЛОН обнаружена на том участке короткого плеча, где картирован ген основного комплекса гистосовместимости (HLA), а наличие ЛОН на длинном плече может свидетельствовать о наличии предполагаемых генов-супрессоров и на этой хромосоме.

По данным разных авторов в опухолях шейки матки частота ЛОН на коротком плече хромосомы 11 варьирует от 16 до 88%, а на длинном от 22 до 92% [114, 120–122], т.е. на хромосоме 11 также могут быть локализованы предполагаемые гены-супрессоры.

Однако следует подчеркнуть, что частота ЛОН на хромосоме 13, где локализован один из основных генов генов-супрессоров – Rb, и на хромосоме 17, где картирован другой ген-супрессор – p53, сравнительно невелика и не превышает 25% [108, 109].

Выявленные аномалии в структуре хромосом являются специфическими для опухолей шейки матки и лишь некоторые из них могут иногда проявляться в опухолях других локализаций. В то же время эти аномалии проявляются не во всех опухолях шейки матки, что может свидетельствовать о том, что в каждой опухоли вторичные генетические изменения могут проявляться по разным участкам клеточного генома. Кроме того, не следует считать, что наличие ЛОН обязательно связано с присутствием в этом локусе гипотетического гена-супрессора. На самом деле выявленные аномалии в подавляющем большинстве случаев касаются сравнительно коротких участков клеточного генома и для полной характеристики участков с делецированными последовательностями еще далеко.

Все приведенные выше данные могут свидетельствовать лишь о том, что действительно геном опухолевой клетки нестабилен, в нем возможно возникновение значительного количества мутаций по разным хромосомам и лишь совокупность этих мутаций приводит к возникновению клона клеток, полностью выходящего из-под контроля клеточной пролиферации.

### ВАКЦИНАЦИЯ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМ КАК ЭФФЕКТИВНАЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Кроме весьма продуктивного вклада в понимание молекулярных механизмов превращения нормальных клеток в опухолевые рак шейки матки оказался тем неопластическим заболеванием, где в недалеком будущем возможен серьезный прогресс в его иммунопрофилактике. И этот прогресс связан именно с тем, что иницирующим фактором опухолей шейки матки являются вирусы папиллом.

За последние несколько лет наметился существенный прогресс в этом направлении, приведший к созданию вакцин, проходящих в настоящее время клинические испытания. Указанные данные суммированы в соответствующей информации Всемирной организации здравоохранения [123].

Используемый в настоящее время подход основан на использовании в качестве вакцинных препараты так называемых «вирус-подобных частиц» (VLP). Эти частицы формируются в бесклеточных системах про- и эукариот, экспрессирующих ген, кодирующий основной белок вирусной частицы L1. В данных системах происходит самосборка этого белка с образованием VLP-частиц, по морфологии сходных с интактными вирионами. Иммунизация такими препаратами сопровождается образованием типоспецифических нейтрализующих антител.

Оказалось, что такие вакцины, полученные для вирусов папиллом крупного рогатого скота и кроликов, эффективно препятствовали проявлению соответствующих поражений после экспериментального заражения вирусом. Эти вакцины были неактивны в том случае, если инфекция имела распространенный характер, и, следовательно, не обладали терапевтическим эффектом. В настоящее время созданы соответствующие вакцинные VLP-препараты и для вирусов папиллом человека и Всемирная организация здравоохранения приступила к широкой программе клинических испытаний и использованию этих препаратов в практике.

Очевидно, что эффективность подобной вакцинации может быть корректно оценена через 10–20 лет, но по ряду косвенных данных о перспективности вакцинации против HPV можно будет судить уже через 5–8 лет.

Таким образом, из представленных выше данных можно сделать несколько выводов, имеющих общебиологическую значимость.

1. Около 15% опухолей человека вызываются вирусами.
2. Этиологическим агентом рака шейки матки являются вирусы папиллом.
3. Эти вирусы содержат специальные гены, играющие ключевую роль в превращении нормальных клеток в опухолевые.
4. Активность этих генов контролируется вирусными и клеточными факторами.
5. Трансформирующие вирусные гены инактивируют функции генов, играющих ключевую роль в контроле прохождения клеточного цикла и клеточной пролиферации.
6. Для формирования моноклональной популяции опухолевых клеток необходимы дополнительные мутации и выселение клона с неконтролируемой пролиферацией.
7. Вакцины против HPV могут оказаться эффективным средством, препятствующим возникновению опухолей шейки матки.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weiss, R. (1999) *Viruses and Human Cancer* (Arrand, J., and Harper, D., ed.), BioSci. Publ., London, pp. 1–17.
2. Zur Hausen, H. (1976) *Cancer Res.*, 36, 530–538.
3. De Villiers, E.M. (1994) *Current Topics in Microbiol. Immunol.*, vol. 86 (H. zur Hausen., ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 1–12.
4. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.*, vol. 64 (1995), IARC Publications, Lyon, pp. 35–283.
5. Zur Hausen, H. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1288, F75–F78.
6. Yablonska, S., Dabrowski, I., and Yakubowicz, K. (1972) *Cancer Res.*, 32, 583–589.
7. Orth, G., Yablonska, S., and Yarsabek-Chorzelska, M. (1979) *Cancer Res.*, 39, 1074–1082.
8. Gissmann, L., and zur Hansen, H. (1980) *Int. J. Cancer*, 25, 605–609.
9. Gissmann, L., Diehl, V., Schultz-Coulon, H., and zur Hausen, H. (1982) *J. Virol.*, 44, 393–400.
10. Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., and zur Hausen, H. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3812–3815.

11. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleihinz, A., Scheulen, W., and zur Hausen, H. (1984) *EMBO J.*, **3**, 1151–1157.
12. Zur Hausen, H. (1996) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **122**, 3–13.
13. Durst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M., and Gissman, L. (1985) *J. Gen. Virol.*, **66**, 1515–1522.
14. Chook, P., and Han, S. (1987) *Virology*, **161**, 259–261.
15. Samoylova, E., Shaihaev, G., Petrov, S., Kisseljova, N., and Kisseljov, F. (1995) *Int. J. Cancer*, **61**, 1–5.
16. Gloss, B., Bernhard, H., Seedorf, K., and Klock, R. (1987) *EMBO J.*, **6**, 3735–3743.
17. Cripe, T., Alderboru, A., Anderson, R., Pakkinen, S., Bergman, T., Haugen, T., Petterson, V., and Turek, L. (1995) *The New Biologist*, **199**, 450–463.
18. Garcia-Garanca, A., Thierry, F., and Yaniv, M. (1988) *J. Virol.*, **62**, 4321–4330.
19. Gius, D., Grossman, S., and Bedol, M. (1988) *J. Virol.*, **62**, 665–672.
20. Bernard, B., Bailly, C., Lenoir, M., Darmon, M., Thierry, F., and Yaniv M. (1989) *J. Virol.*, **63**, 4317–4324.
21. Romanczuk, H., and Howley, P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3159–3163.
22. Bouvard, V., Storey, A., Pim, D., and Banks, L. (1994) *EMBO J.*, **13**, 5451–5459.
23. Offord, E., and Beard, P. (1990) *J. Virol.*, **64**, 4792–4798.
24. Bauknecht, T., Ange, P., Royer, H.-D., and zur Hausen, H. (1992) *EMBO J.*, **11**, 4607–4617.
25. May, M., Dong, X.-P., Beyer-Finkler, E., Stubenrauch, F., Fuchs, G., and Pfister, H. (1994) *EMBO J.*, **13**, 1460–1466.
26. Hoppe-Seyler, F., and Butz, K. (1992) *Nucl. Acid. Res.*, **20**, 6701–6706.
27. Butz, K., and Hoppe-Seyler, F. (1993) *J. Virol.*, **67**, 6467–6486.
28. Chan, E., Klock, G., and Bernard, H.-U. (1989) *J. Virol.*, **63**, 3261–3269.
29. Mittal, R., Pater, A., and Pater, M. (1993) *J. Virol.*, **67**, 5665–5659.
30. Medina-Martinez, O., Morales-Peza, N., and Yaniv, M. (1996) *J. Virol.*, **217**, 392–396.
31. Mack, D., and Laimins, L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9102–9106.
32. Hoppe-Seyler, F., Butz, K., and zur Hausen, H. (1991) *J. Virol.*, **65**, 5613–5618.
33. Yakawa, K., Butz, K., and Yasui, T. (1996) *J. Virol.*, **70**, 10–16.
34. Chong, T., Apt, D., and Gloss, B. (1991) *J. Virol.*, **65**, 5933–5943.
35. Ishiji, T., Lace, M., Purkkinen, S., Anderson, R., Haugen, T., Cripe, T., Xiao, J., Davidson, I., Chambon, P., and Turek, L. (1992) *EMBO J.*, **11**, 2271–2281.
36. Smotkin, D., and Wettstein, F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4680–4684.
37. Schwarz, E., Freese, U., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Strenlau, A., and zur Hausen, H. (1985) *Nature*, **314**, 111–114.
38. Smotkin, D., Prokoph, H., and Wettstein, F. (1989) *J. Virol.*, **63**, 1441–1447.
39. Grossman, S., Mora, R., and Laimins, L. (1989) *J. Virol.*, **63**, 366–374.
40. Grossman, S., and Laimins, L. (1989) *Oncogene*, **4**, 1089–1093.
41. Hawley-Nelson, P., Vousden, K., Hubbert, N., Lowy, D., and Shiller, J. (1989) *EMBO J.*, **8**, 3905–3910.
42. Stoppler, M., Ching, K., and Stoppler, U. (1989) *J. Virol.*, **70**, 6987–6993.
43. Band, V., de Caprio, J., Delmolino, L., Kalesa, V., and Sager, R. (1991) *J. Virol.*, **65**, 6671–6676.
44. Storey, A., and Banks, L. (1993) *Oncogene*, **8**, 819–824.
45. Lambert, P., Pan, H., Pilot, H., Liem, M., and Griep, A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5583–5587.
46. Halbert, C., Demers, G., and Galloway, D. (1992) *J. Virol.*, **66**, 2125–2134.
47. Haffner, R., and Oren, M. (1995) *Curr. Opin. Gevet. Dev.*, **5**, 84–90.
48. El-Deiry, W., Tokino, T., Velculesen, V., Levy, D., Parsons, R., Lin, D., Mercer, W., Kinzler, K., and Vogelstein, B. (1993) *Cell*, **75**, 817–825.
49. Migashit, T., and Reed, J. (1995) *Cell*, **80**, 293–299.
50. Kastan, M., Zhan, Q., El-Deiry, W., Carrier, F., Jacks, T., Walsch, W., Plankett, B., Vogelstein, B., and Formance, A. (1992) *Cell*, **71**, 587–597.
51. Fritsche, M., Haessler, C., and Brandner, E. (1993) *Oncogene*, **8**, 307–318.
52. Moll, U., Rion, G., and Levine, A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7262–7266.
53. Lane, D., and Crawford, L. (1979) *Nature*, **278**, 261–263.
54. Sarnow, P., Ho, Y., Williams, J., and Levine, A. (1982) *Cell*, **28**, 387–394.
55. Habbert, N., Sedman, S., and Schiller, J. (1992) *J. Virol.*, **66**, 6237–6241.
56. Scheffner, M., Werness, B., Huibregste, J., Levine, A., and Howley, P. (1990) *Cell*, **63**, 1129–1136.
57. Ciechanover, A. (1994) *Cell*, **79**, 13–21.
58. Scheffner, M., Huibregste, J., Vierstra, R., and Howley, P. (1993) *Cell*, **75**, 455–505.
59. White, A., Livanos, E., and Tlsty, T. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 666–677.
60. Helland, A., Holm, R., Kristensen, G., Kaern, G., Karlson, E., and Trope, C. (1993) *J. Pathol.*, **171**, 105–114.
61. Desaintes, C., Hallez, S., van Alphen, N., and Burney, A. (1992) *J. Virol.*, **66**, 325–333.
62. Pan, H., and Griep, A. (1995) *Genes. Dev.*, **9**, 2157–2169.
63. Klingelutz, A., Foster, S., and Mc Dougall, J. (1996) *Nature*, **380**, 529–531.
64. Chen, J., Reid, C., Band, V., and Androphy, E. (1995) *Science*, **269**, 529–531.
65. Keen, N., Elston, R., and Crawford, L. (1994) *Oncogene*, **9**, 1493–1499.
66. Kinoshita, T., Shirasawa, H., Shino, Y., Moria, H., Desbarats, L., Eiler, M., and Simiz, B. (1997) *Virology*, **232**, 53–61.
67. Armstrong, D., and Roman, A. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192**, 1380–1387.
68. Vousden, K., and Yat, P. (1989) *Oncogene*, **4**, 153–158.
69. Phelps, W., Munger, K., Yee, C., Barnes, J., and Howley, P. (1992) *J. Virol.*, **66**, 2418–2427.
70. Watanabe, S., Kanda, T., Sato, H., Furuno, A., and Yoshike, K. (1990) *J. Virol.*, **64**, 207–214.
71. Dyson, N., Howley, P., Munger, K., and Harlow, E. (1989) *Science*, **243**, 934–937.
72. Heck, D., Yee, C., Howley, P., and Munger, K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4442–4446.
73. Patrick, D., Oliff, A., and Heimbrook, D. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 6842–6850.
74. Firzlaiff, J., Luscher, B., and Eisenmann, B. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5187–5191.
75. Massimi, P., Pim, D., Storey, A., and Banks, L. (1996) *Oncogene*, **12**, 2325–2330.
76. Barbosa, M., Lowy, D., and Schiller, Y. (1989) *J. Virol.*, **63**, 1404–1407.
77. McIntyre, M., Frattini, M., Grossman, S., and Laimins, L. (1993) *J. Virol.*, **67**, 3432–3450.
78. Kanda, T., Zanma, S., Watanabe, S., Fukuma, A., and Yoshiike, K. (1991) *Virology*, **182**, 723–731.

79. Zatzepina, O., Braspenning, Y., Robberson, D., Hajibagheri, H., Blight, K., Ely, S., Hibma, M., Spitkovsky, D., and Tomassino, M. (1997) *Oncogene*, **14**, 1137–1145.
80. Bedell, M., Jones, K., Grossman, S., and Laimins, L. (1989) *J. Virol.*, **63**, 1247–1259.
81. Kanda, T., Watanabe, S., and Yoshiiki, K. (1988) *Virology*, **165**, 321–325.
82. Barbosa, M., Vass, W., Lowy, D., and Schiller, J. (1991) *J. Virol.*, **65**, 292–298.
83. Yutsudo, M., Okamoto, J., and Hakura, A. (1988) *Virology*, **166**, 594–597.
84. Matlashewski, G., Schneider, J., Banas, L., Jones, N., Murray, A., and Crawford, L. (1987) *EMBO J.*, **6**, 1741–1746.
85. Munger, K., Phelps, W., Babb, V., Howley, P., and Schlegel, R. (1989) *J. Virol.*, **63**, 4417–4421.
86. Wazer, D., Liu, X., Chu, Q., Gao, Q., and Band, V. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3687–3691.
87. Tsao, S., Mok, S., and Fey, E. (1995) *Exp. Cell. Res.*, **218**, 499–507.
88. Halbert, C., Demers, G., and Galloway, D. (1992) *J. Virol.*, **66**, 2125–2134.
89. Sherr, C. (1996) *Science*, **274**, 1672–1677.
90. Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindl, R., Botz, J., and Jansen-Durr, P. (1996) *Oncogene*, **13**, 2323–2330.
91. Boyer, S., Wazer, D., and Band, V. (1996) *Cancer. Res.*, **56**, 4620–4624.
92. Wu, E., Clemens, K., Heck, D., and Munger, K. (1993) *J. Virol.*, **67**, 2402–2407.
93. Dyson, N., Guida, P., Munger, K., and Harlow, E. (1992) *J. Virol.*, **66**, 6893–6902.
94. Zerfass, K., Levy, L., Cremonesi, C., Ciccoloni, F., Jansen-Durr, P., Crawford, L., Rolston, R., and Tomassino, M. (1995) *J. Gen. Virol.*, **76**, 1815–1820.
95. Phelps, W., Bagchi, S., Barnes, J., Kraus, V., Munger, C., Howley, P., and Newins, G. (1991) *J. Virol.*, **65**, 6922–6930.
96. Lam, E., Morris, J., Davies, R., Crook, T., Watson, R., and Vousden, K. (1994) *EMBO J.*, **13**, 871–878.
97. Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Berges, J., Middendorf, S., Jansen-Durr, P., and Henglein, B. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11264–11268.
98. Antinore, M., Birrer, M., Patel, D., Nader, L., and McChance, D. (1996) *EMBO J.*, **70**, 332–340.
99. Mazzarelli, J., Atkins, G., Geisberg, Y., and Ricciardi, R. (1995) *Oncogene*, **11**, 1859–1864.
100. Tomassino, M., Adamczewski, J., Carlotti, F., Barth, C., Marcetti, R., Contorni, M., Cavalielli, F., Hunt, T., and Crawford, L. (1993) *Oncogene*, **8**, 195–202.
101. McIntyre, M., Ruesch, M., and Laimins, L. (1996) *Virology*, **215**, 73–83.
102. Shirodkar, S., Even, M., and de Caprio, J. (1992) *Cell*, **62**, 157–166.
103. Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindl, R., Botz, J., and Jansen-Durr, P. (1996) *Oncogene*, **13**, 2323–2330.
104. White, A., Livanos, E., and Tlsty, T. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 667–677.
105. Pan, H., and Griep, A. (1995) *Genes. Dev.*, **9**, 2157–2169.
106. Putenvettil, J., Frederickson, S., and Reznikoff, C. (1996) *Oncogene*, **13**, 1123–1131.
107. Weinberg, R. (1995) *Cell*, **81**, 323–330.
108. Mitra, A., Rao, P., and Pratap, M. (1994) *Cancer Genet. Cytogenet.*, **76**, 56–58.
109. Mullokandov, M., Khodilov, N., Atkin, N., Burk, R., Johnson, A., and Kinger, H. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 197–205.
110. Kersemakers, A., Hermans, J., Fleuren, G., and van der Vijver, H. (1998) *Br. J. Cancer*, **69**, 181–186.
111. Greenspan, D., Connolly, D., Rong, W., Lei, S., Vogelstein, T., Kim, Y., Mok, J., Munoz, N., Bosch, F., Keerti, S., and Cho, K. (1997) *Cancer Res.*, **57**, 4692–4698.
112. Larson, A., Kern, S., Curtiss, S., Gordon, R., Cavenee, W., and Humpton, G. (1997) *Cancer Res.*, **57**, 4082–4090.
113. Ku, W., Liu, I., Yen, M., Chang, C., Yue, C., Ma, Y., Chang, S., Ne, H., Wu, C., and Chen, C. (1997) *Int. J. Cancer*, **72**, 270–276.
114. Kohno, T., Takayama, H., Hamaguchi, M., Takano, T., Yamaguchi, N., Tsuda, H., Hirahashi, S., Vissing, H., Shimisuu, M., Oshimura, M., and Yokota, K. (1993) *Oncogene*, **8**, 1825–1832.
115. Hampton, G., Larson, A., Baergen, R., Sommers, R., Kern, S., and Cavenee, W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6701–6709.
116. Mitra, A., Murty, V., Singh, V., Li, R., Pratap, M., Sodhani, P., Luthra, U., and Chaganti, R. (1995) *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**, 742–745.
117. Kisseljov, F., Semjonova, L., Samoylova, E., Mazurenko, N., Komissarova, E., Zourbitskaya, E., Gritzko, T., Lozachenko, V., Netchuskin, M., Petrov, S., Smirnov, A., and Alonso, A. (1996) *Int. J. Cancer*, **69**, 484–487.
118. Rader, J., Kamarasova, T., Huettner, P., Li, L., Li, Y., and Gerhard, D. (1996) *Oncogene*, **13**, 2737–2741.
119. Mazurenko, N., Attalebi, M., Gritzko, T., Semjonova, L., Pavlova, L., Sakharova, J., and Kisseljov, F. (1999) *Oncol. Rep.*, **6**, 859–863.
120. Hampton, G., Penny, L., Baergen, R., Larson, A., Brewer, C., Liao, S., Busby-Earle, R., Williams, A., Steel, C., Bird, C., Stanbridge, E., and Evans, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6953–6957.
121. Srivatsan, E., Misra, B., Venugopalan, M., and Wylczynski, S. (1991) *Am. J. Hum. Genet.*, **49**, 868–877.
122. Bethwaite, P., Koreth, J., Herrington, C., and McGee, L. (1995) *Br. J. Cancer*, **71**, 814–818.
123. The Current Status of Development of Prophylactic Vaccines Against Human Papillomavirus Infection (1999), WHO Press, pp. 1–18.



**VIRUS-ASSOCIATED HUMAN TUMORS:  
CERVICAL CARCINOMAS AND PAPILLOMA VIRUSES****F.L. Kissel'jov**

*Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,  
Russian Academy of Medical Sciences,  
Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478; fax: (7-095) 323-5733,  
E-mail: f.kis@cityline.ru*

Submitted September 17, 1999

The latest experimental data on the role of viruses in the origin of human tumors have been discussed. This group consist of T-cell leukemia virus type 1 (HTLV I), herpes viruses (HHV 8 and Epstein-Barr virus), hepatitis B virus and human papilloma viruses. The most typical feature of these viruses is very long latent period between initial infection and development of the disease that varied between 10 till 40 years. The mechanisms of malignant cell conversion is specific for each viral type, but mainly connected with functional destruction of cellular genes participating in control of cell division and proliferation. It can be direct inactivation of tumor suppressor genes by interaction with viral gene products (as in the case with papilloma viruses), or as a result of trans-activation action of viral gene products on cellular genes, that modulated cellular proliferation, as in the case of hepatitis B and HTLV I viruses. Viruses play an initiative role and for the full expression of oncogenic potential of the viral genes an additional genetic changes in the genome of infected cells are necessary and only such cells will lead to the formation of monoclonal cell population with uncontrolled proliferation. New approaches for the creation of the vaccines against cancers associated with viruses (hepatocellular carcinomas and cervical tumors) are in progress. These vaccines are effective as profilactic agents in experimental models and start to be used for human vaccination.

**KEY WORDS:** tumors, cervical cancer, transformation, mechanisms, papilloma viruses, transforming genes, oncogenes, tumor-suppressor genes.

УДК 576.385.5

## ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР И РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VIVO*: ПРИБОРЕТЕНИЕ НОВЫХ МЕХАНИЗМОВ ЗАЩИТЫ

### Обзор

© 2000 г. Г.И. Дейчман

Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115478 Москва, Каширское ш., 24; факс: (095)324-1205,  
электронная почта: [antitum@space.ru](mailto:antitum@space.ru)

Поступила в редакцию 05.10.99

Обзор суммирует результаты, полученные в последние 10 лет в лаборатории автора и сотрудничающих лабораторий, и имеет целью привлечь внимание исследователей к приобретаемым *in vivo* дискретным биохимическим механизмам защиты злокачественных вариантов опухолевых клеток против эффекторов врожденного противоопухолевого иммунитета. Показано, что в процессе прогрессии *in vivo* возникают и отбираются варианты опухолевых клеток, характеризующиеся новыми свойствами: высоким уровнем  $H_2O_2$ -катаболизирующей ( $H_2O_2^{CA}$ ) (антиоксидантной) активности и способностью к немедленному выбросу простагландина  $E_2$ -типа ( $PGE^S$ ) при контакте с НК-клетками, Мф и Нф; экспрессия [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ]-фенотипа обеспечивает опухолевые клетки двумя механизмами эффективной локальной защиты против эффекторов врожденного и приобретенного специфического противоопухолевого иммунитета, что выражается в снижении в десятки и сотни раз эффективности отторжения опухолевых клеток у иммунных и нормальных животных. Трансформация нормальных фибробластов *in vitro*, спонтанная или индуцированная онкогенами *LTSV40*, *Ela.b*, *Ha-ras*, *myc*, а также *p53*<sup>175</sup> и *bcl-2*, не приводит к экспрессии [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ]-фенотипа, однако при последующем росте *in vivo* всех перечисленных выше трансформантов опухолевые клетки отбираются по [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ]-фенотипу с одновременным 30–200-кратным повышением уровня их туморогенности (сопровождаемой или не сопровождаемой спонтанной метастатической активностью). В отличие от трансформации перечисленными выше онкогенами трансформация нормальных клеток геном *v-src* приводит к экспрессии [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ]-фенотипа. Представлены данные в пользу определяющей роли гена *v-src* в экспрессии [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ]-фенотипа. При первичном вирусном канцерогенезе (*SV40*; *SA7(C8)* и *RSV-SR*) естественный отбор клеток, экспрессирующих [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ]-фенотип, начинается еще во время латентного периода и может быть завершен к моменту появления первичных опухолей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** трансформация, канцерогенез, прогрессия опухолей *in vivo*, антиоксидантная и  $PGE_2$ -секретирующая активность опухолевых клеток, механизмы защиты опухолевых клеток, врожденный и специфический противоопухолевый иммунитет.

Проблема взаимоотношений между неопластическими клетками и системами врожденного и специфического иммунитета *in vivo* находит отражение в следующих трех основных аспектах: 1) защита хозяина, т.е. механизмы распознавания и элиминации мутантных, трансформированных и опухолевых клеток эффекторами системы врожденного противоопухолевого иммунитета (и специфического противоопухолевого иммунитета в случае антигенных опухолей); 2) механизмы защиты трансформированных и опухолевых клеток против эффекторов системы врожденного противоопухолевого иммунитета; 3) влияние селективного давления врожденного и специфического противоопухолевого иммунитета хозяина на прогрессию опухоли.

Первый аспект проблемы исследуется более 30 лет в основном с помощью опытов по трансплантации опухолей на лабораторных животных, в том числе имеющих определенные гене-

тические дефекты иммунной системы, и цитотоксической активности (ЦТА) *in vitro* резидентных и активированных макрофагов (Мф), дендритных клеток (ДК), естественных киллеров (НК-клеток), нейтрофилов (Нф), а также Т-лимфоцитов, направленной против трансформированных и опухолевых клеток различного происхождения. Неспецифическое распознавание опухолевых клеток эффекторами врожденного противоопухолевого иммунитета и подавление их роста (или, наоборот, стимуляция пролиферации) связаны с комплексом межклеточных взаимодействий и индукцией сети различных цитокинов, создаваемой при кооперации ДК, Мф, НК-клеток, Нф и опухолевых клеток при участии (или неучастии на ранних этапах канцерогенеза) активированных Т-клеток. Этот аспект врожденного противоопухолевого иммунитета давно и интенсивно изучается и освещен в ряде обзоров [1–8].

*In vivo* в периоды появления, роста и диссеминации опухолевые клетки постоянно испытывают стресс, вызванный различными рост-ингибирующими и повреждающими клетки сигналами, в том числе ЦТА ДК, Мф, НК-клеток и Нф. Апоптоз является механизмом гибели их подавляющего большинства. Выживающие опухолевые клетки в первичном очаге опухолевого роста (как и в отдаленных депозитах) развиваются в условиях продолжающегося стресса и селективного давления эффекторов врожденного противоопухолевого иммунитета. Исследование отобранных *in vivo* высокозлокачественных вариантов опухолевых клеток по сравнению с их трансформированными *in vitro* предшественниками обычно демонстрирует 10–100-кратное увеличение туморогенной активности (ТГА) и (менее регулярно) – усиление метастатической активности, спонтанной или экспериментальной (СМА, ЭМА), а также некоторые другие новые характеристики. Среди них важно отметить повышение резистентности опухолевых клеток к ЦТА Мф, НК-клеток и Нф. Очевидно, что возникновение моноклональной опухоли связано с отбором чрезвычайно редких вариантов опухолевых клеток, обладающих различными (иногда очень специфическими) механизмами преодоления этого контроля хозяином.

Другим типом селективного давления хозяина на гетерогенную популяцию опухолевых клеток являются рост-регулирующие сигналы нормального клеточного окружения, положительные и отрицательные [9]. Однако в отличие от эффекторов врожденного противоопухолевого иммунитета, таких как ДК, Мф, НК-клетки и Нф, клетки нормального микроокружения, по-видимому, не активируются при контактном взаимодействии с опухолевыми клетками (по крайней мере это не установлено) и их влияние, как правило, имеет характер эффекта, либо цитостатического, либо стимулирующего рост опухолевых клеток, но не цитолитического.

Огромным преимуществом системы врожденного противоопухолевого иммунитета по сравнению со специфическим противоопухолевым иммунитетом является его постоянная готовность распознавать появление *in vivo* очень небольшого числа (даже единичных) трансформированных и опухолевых клеток независимо от того, экспрессируют ли они специфические опухолевые антигены. *A priori* очевидно, что наиболее эффективный контроль врожденного противоопухолевого иммунитета над возникновением первичных опухолей может осуществляться в начале латентного периода, когда число опухолевых клеток невелико, а их эволюционные генетические изменения, как правило,

минимальны [4, 5]. В это время лишь очень немногие трансформированные *in vivo* клетки могут ускользнуть от эффективного распознавания и элиминации системой врожденного противоопухолевого иммунитета и начать размножаться. Однако этот скрытый период развития опухоли, возможно, является и наиболее решающим в канцерогенезе, поскольку именно в это время коллизия между пролиферативной активностью трансформированных *in vivo* клеток и способностью системы врожденного иммунитета хозяина обнаруживать их появление и отторгать решается в пользу лишь одной из них.

До последнего времени роль естественного (врожденного) иммунитета в защите организма хозяина, наиболее интенсивно исследуемая в отношении бактериальных и вирусных инфекций, рассматривалась отдельно от механизмов специфического Т-клеточного иммунитета. Экспериментальный и теоретический анализ реакций врожденного иммунитета против инфекционных и аутоиммунных процессов в настоящее время рассматривает возможность того, что врожденный иммунитет не только использует свои неклональные механизмы распознавания и элиминации опасных экзогенных агентов, но и играет инструктивную и контролируемую роли в индукции специфического (адаптивного) иммунитета [10–13].

Эта новая система взглядов на соотношение врожденного и приобретенного иммунитета в своих основных положениях, по-видимому, применима также к области противоопухолевого иммунитета; особенно это касается неклональных механизмов распознавания опухолевых клеток эффекторами врожденного иммунитета. Однако в отличие от бактериальных и вирусных инфекций с их, как правило, короткими латентными периодами, острым течением и эффективным развитием реакций иммунитета, гуморального и/или клеточного, система врожденного противоопухолевого иммунитета в случае спонтанных опухолей имеет дело с отсутствием или небольшими антигенными отличиями между нормальными и аутологичными опухолевыми клетками и, как правило, длительным периодом канцерогенеза, характеризующегося рядом онкогенетических этапов эволюции опухолей, существенно меняющих биологические свойства опухолевых клеток.

Настоящий обзор посвящен фенотипическим изменениям опухолевых клеток, связанным с приобретением ими *in vivo* дискретных механизмов резистентности к ЦТА эффекторов системы врожденного противоопухолевого иммунитета, а также роли этих механизмов в выживании опухолевых клеток *in vivo* в нормальном и иммунном

организме, естественном отборе и прогрессии опухолей. Этот аспект канцерогенеза является областью основных интересов и экспериментальных исследований нашей и сотрудничающих с нами лабораторий на протяжении последних 10 лет.

Наш основной подход в этих исследованиях состоял в прослеживании процесса опухолевой прогрессии, начиная с трансформации нормальных клеток *in vitro* (или *in vivo*) различными онкогенами или спонтанно, с последующим естественным отбором их потомков *in vivo* и приобретением ими злокачественного фенотипа. Этот подход позволяет исследовать прогрессию индивидуальных опухолей *in vivo* в динамике и идентифицировать те дискретные изменения опухолевых клеток, которые регулярно возникают при их злокачественном развитии, т.е. вторичные фенотипические изменения опухолевых клеток, характерные для прогрессии опухоли. Было обнаружено, что в процессе роста *in vivo* клеток, трансформированных *in vitro*, происходит естественный отбор вариантов, обладающих высоким уровнем антиоксидантной активности, выражающейся в  $H_2O_2$ -катаболизирующей активности ( $H_2O_2^{CA}$ ) и приобретением нового качества – способности к немедленному выбросу простагландина  $E_2$  типа ( $PGE^S$ ) при контактном взаимодействии с НК-клетками, Мф и Нф. Исключительные селективные преимущества опухолевых клеток, связанные с приобретением ими [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ]-фенотипа и соответственно защиты против эффекторов врожденного и приобретенного Т-клеточного иммунитета, обязательный характер приобретения этих свойств в процессе опухолевой прогрессии и связь с опухоленностью составляют уникальность описанного фенотипа по сравнению со многими другими вторичными изменениями опухолевых клеток, более или менее регулярно возникающими в процессе опухолевой прогрессии *in vivo*.

### 1. ЭКСПРЕССИЯ [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ]-ФЕНОТИПА ПРИ ПРОГРЕССИИ *IN VIVO* КЛЕТОК, СПОНТАННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *IN VITRO*

Первые наблюдения по экспрессии [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ]-фенотипа были сделаны нами более 10 лет назад в процессе естественного отбора *in vivo* вариантов опухолевых клеток Сирийского хомяка, различающихся по уровню ТГА и СМА. Исходно это были спонтанно-трансформированные *in vitro* клетки штамма ХЭТР, полученные в нашей лаборатории. Клетки этого штамма характеризуются низким уровнем ТГА

и ЭМА, не метастазируют спонтанно, неиммунногенны и высокочувствительны к цитотоксической активности Мф и НК-клеток. До использования в данной работе они не проходили отбора *in vivo*. Представлялось важным выяснить, в чем состоят дискретные отличия между родительскими клетками штамма ХЭТР и их отобранными *in vivo* злокачественными вариантами.

В предварительных опытах с помощью количественных тестов на ТГА (определяемого как логарифм 50%-ной прививочной дозы ( $\log TrD_{50}$ )), ЭМА и СМА было показано, что отобранные *in vivo* высокотуморогенные, метастазирующие или не метастазирующие варианты этих клеток ( $CMA^+$  и  $CMA^-$ ) характеризуются существенно более высоким уровнем резистентности к ЦТА Мф и НК-клеток по сравнению с родительскими клетками, подтверждая тем самым наблюдения, ранее опубликованные другими авторами [14–19]. Данные, опубликованные Натаном и соавт. [20] и Адамсом и Натаном [21], показали, что резистентность ряда мышинных линий опухолевых клеток различного гистогенеза к ЦТА Мф коррелирует с их антиоксидантной активностью, определяемой суммарной активностью таких ферментов, как каталаза,  $CuZn$ -супероксиддисмутаза ( $CuZn-COD$ ) и глутатионпероксидаза. В этот же период в литературе появилась серия независимых работ, связавших резистентность некоторых линий опухолевых клеток к ЦТА НК-клеток с их способностью секретировать простагландины  $E_2$ -типа, нейтрализующие ЦТА НК-клеток [22–25].

В связи со всеми этими данными в серии опытов мы сравнили 26 отобранных *in vivo* индивидуальных клеточных линий одного происхождения (штамма ХЭТР) по следующим характеристикам: чувствительности (или резистентности) исследуемых клеток к повреждению  $H_2O_2$  ( $H_2O_2^R$ ), способности экстрактов исследуемых клеток (стандартизованных по белку) катаболизировать  $H_2O_2$  ( $H_2O_2^{CA}$ ), активности каталазы,  $CuZn-COD$ , глутатиона и его оксидазы и пероксидазы (в экстрактах исследуемых клеток), способности опухолевых клеток секретировать  $PGE_2$  при контактном взаимодействии с НК-клетками и инактивировать их ЦТА, возможную связь  $PGE_2$ -секретирующей активности ( $PGE_2^S$ ) с чувствительностью исследуемых клеток к ЦТА НК-клеток и ТГА, ЭМА и  $CMA$  [5, 26–28].

Для отбора вариантов этих клеток *in vivo* при их подкожном росте на нормальных животных была разработана стандартная процедура. Каждый цикл отбора начинался с подкожной прививки  $2,0 \cdot 10^4$  выращенных *in vitro* в культуре ткани исследуемых опухолевых клеток; продолжительность цикла их роста *in vivo* составля-

ла 55–60 дней (рис. 1). Затем животных усыпляли и клетки выросших опухолевых узлов от индивидуальных животных вновь переводили в культуру ткани и после 3–5 пассажей *in vitro* (для освобождения от стромальных клеток хозяина) исследовали их характеристики.

Для определения чувствительности опухолевых клеток к повреждению  $H_2O_2$  ( $H_2O_2^R$ ) был использован тест на включение  $^3H$ -TdR в интактные клетки (контроль) и в клетки, обработанные пятью двукратно различающимися дозами  $H_2O_2$  (от 1,65 до 27,0 мМ). Для определения  $H_2O_2^{CA}$  использована реакция люминолзависимой хемилюминисценции, учитываемая по времени, необходимому для инактивации 95%-ной  $H_2O_2$  в присутствии экстракта исследуемых клеток (по сравнению со временем, необходимым для инактивации  $H_2O_2$  в растворе, не содержащем клеточного экстракта).  $H_2O_2^{CA}$  считали положительной, если скорость инактивации 95%-ной  $H_2O_2$ , добавленной к экстракту опухоли, не превышала 3 мин. Эти два теста оказались удобными для оценки суммарной антиоксидантной активности исследуемых клеток и дали принципи-

ально совпадающие результаты. Детали использованных нами стандартных методов по определению  $H_2O_2^R$  и  $H_2O_2^{CA}$ , а также некоторых энзиматических антиоксидантов представлены в ряде публикаций [26–29].

Для определения  $PGE_2^S$ -активности опухолевых клеток был использован стандартный радиоиммуноэссей (RIA) [24], а также разработан специально для данной работы высокочувствительный и высоковоспроизводимый биологический тест, основанный на способности  $PGE_2$  инактивировать ЦТА НК-клеток. Этот метод позволяет определять биологическую активность нативного  $PGE_2$ , секретируемого опухолевыми клетками, и имеет ряд важных преимуществ по сравнению с RIA [30].

Используемый в лаборатории количественный тест по определению ТГА состоит в подкожной прививке пяти-шести нормальным Сирийским хомякам четырех 10-кратно различающихся доз исследуемых опухолевых клеток с последующим учетом конечных (через 55–60 дней) результатов прививки и определением 50%-ной прививочной их дозы ( $ig\ TtD_{50}$ ). Этот метод

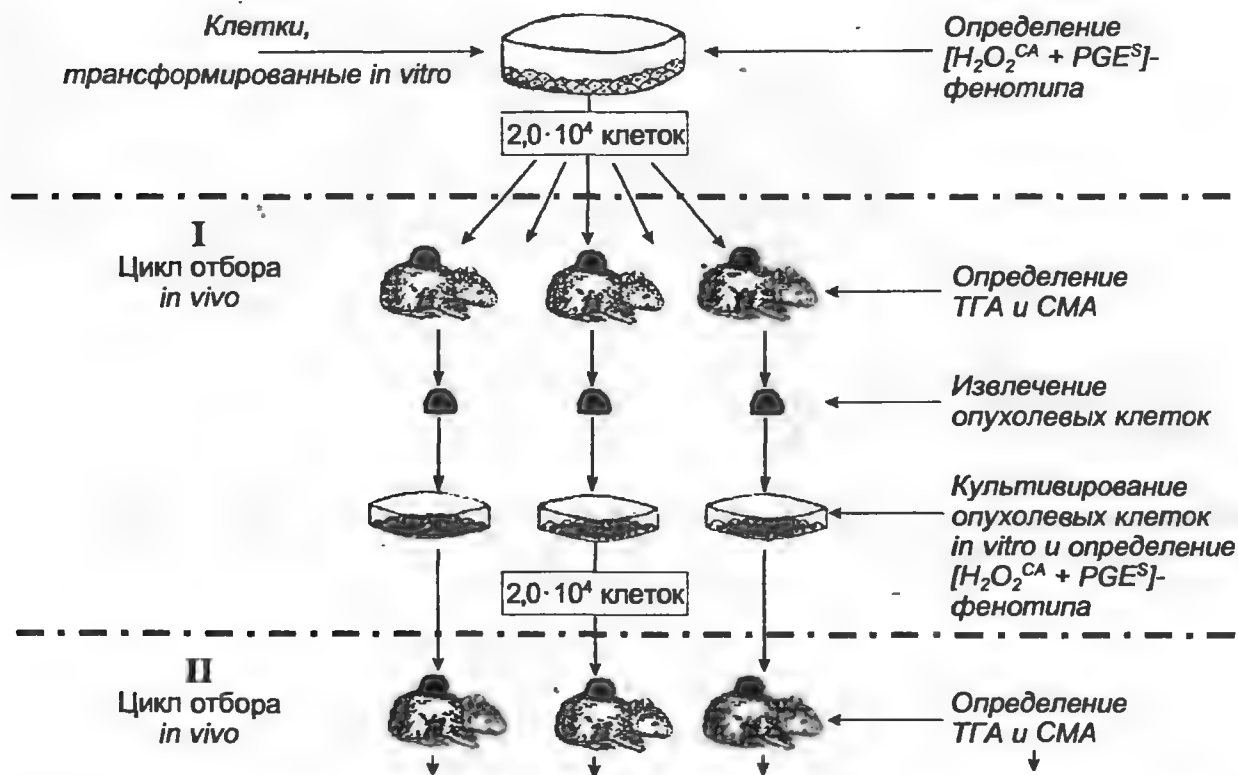


Рис. 1. Естественный отбор вариантов опухолевых клеток при подкожном росте опухоли. Принятые сокращения:  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип –  $H_2O_2$ -катаболизирующая активность,  $PGE^S$  –  $PGE_2$ -секретирующая активность, ТГА – опухолевая активность, СМА – спонтанная метастатическая активность



представляется высокоинформативным, а его высокая воспроизводимость позволяет объективно оценить уровень ТГА исследуемых линий опухолевых клеток. Были также использованы стандартные методы количественной оценки ЭМА, СМА, а также чувствительности клеток к ЦТА Мф, Нф и НК-клеток.

С помощью этих методов было показано, что отобранные *in vivo* высокотуморогенные варианты клеток ХЭТР в отличие от низкотуморогенных вариантов и от родительских клеток ХЭТР характеризуются более чем 10-кратным увеличением уровня  $H_2O_2^R$ , а также существенным ускорением  $H_2O_2^{CA}$  (от 15–20 мин, что характерно для экстракта родительских клеток ХЭТР, до 20–180 с в случае его высокотуморогенных вариантов). Отмечены также стабильное увеличение активности каталазы на 20–60%, снижение активности  $CuZn$ -СОД, а также реакций перекисного окисления липидов высокотуморогенных вариантов клеток. Изменения других антиоксидантных ферментов были менее регулярными [26–28].

Отобранные *in vivo* высокотуморогенные варианты клеток ХЭТР оказались существенно более резистентными к ЦТА НК-клеток и, более того, при прямом контакте с НК-клетками последние быстро утрачивали ЦТА. Предварительная обработка опухолевых клеток индометацином отменяла эти эффекты, подтверждая таким образом ранее представленные доказательства роли  $PGE_2$  секретируемого опухолевыми клетками в инактивации ЦТА НК-клеток [22–24, 30–33]. Эти эффекты подавления ЦТА НК-клеток не наблюдались при взаимодействии НК-клеток с родительскими клетками ХЭТР и их отобранными *in vivo* низкотуморогенными вариантами, не секретирующими  $PGE_2$ .

Показано, что выброс в среду  $PGE_2$  опухолевыми клетками, начинающийся немедленно после контактного сигнала НК-клеток, продолжается 3–4 ч с пиком продукции через 30–60 мин [34]. Перенос  $PGE_2$ , продуцированных высокотуморогенными вариантами клеток, на интактные НК-клетки приводил к полной инактивации ЦТА НК-клеток по отношению к стандартным мишеням. Предварительная (2 ч) обработка высокотуморогенных опухолевых клеток индометацином до их контакта с НК-клетками или Мф предотвращала выброс  $PGE_2$  [33, 35].

Неожиданным явилось то обстоятельство, что два биохимически различных свойства опухолевых клеток, такие как их антиоксидантная активность ( $H_2O_2^{CA}$  или  $H_2O_2^R$ ) и  $PGE_2^S$ , были, по-видимому, приобретены опухолевыми клетками в процессе отбора *in vivo* высокотуморогенных вариантов штамма ХЭТР одномомент-

но, как кластер признаков. Среди большого числа исследованных линий клеток ХЭТР не обнаружены промежуточные варианты: во всех отобранных *in vivo* линиях эти два свойства либо оба экспрессировались, либо оба не экспрессировались [27]. Была отмечена также положительная корреляция между экспрессией [ $H_2O_2^{CA}$  +  $PGE_2^S$ ]-фенотипа и высоким уровнем ТГА (и ЭМА) опухолевых клеток, смысл которой до последнего времени оставался неясным (см. главу V). Однако экспрессия [ $H_2O_2^{CA}$  +  $PGE_2^S$ ]-фенотипа, характерная для всех высокотуморогенных линий ХЭТР, могла сопровождаться или не сопровождаться СМА. Таким образом, экспрессия [ $H_2O_2^{CA}$  +  $PGE_2^S$ ]-фенотипа, по-видимому, является необходимой, но недостаточной для проявления СМА опухолевых клеток.

Биохимически различные свойства опухолевых клеток, формирующие [ $H_2O_2^{CA}$  +  $PGE_2^S$ ]-фенотип (т.е.  $H_2O_2^{CA}$  и  $PGE_2^S$ ), по-видимому, ответственны за два различных механизма защиты этих клеток против ЦТА Мф и Нф, с одной стороны, и ЦТА НК-клеток – с другой (рис. 2). Так, большинство вариантов линий ХЭТР, экспрессирующих и неэкспрессирующих [ $H_2O_2^{CA}$  +  $PGE_2^S$ ]-фенотип, при исследовании на чувствительность к ЦТА резидентных и активированных Мф показали наличие четкой корреляции между экспрессией данного фенотипа и 2–5-кратным увеличением резистентности к ЦТА этих эффекторов по сравнению с родительскими клетками ХЭТР и их неэкспрессирующими [ $H_2O_2^{CA}$  +  $PGE_2^S$ ]-фенотип вариантами [36, 37]. Усиление антиоксидантной активности злокачественных вариантов опухолевых клеток, т.е.  $H_2O_2^R$  и  $H_2O_2^{CA}$ , как правило, коррелирующее с повышением уровня активности каталазы, по-видимому, защищает опухолевые клетки от повреждения активными формами кислорода и  $H_2O_2$ , продуцируемыми Мф и Нф.

В отличие от этого выброс  $PGE_2$  теми же опухолевыми клетками в контактном взаимодействии с НК-клетками и Мф приводил к подавлению ЦТА НК-клеток, демонстрируя таким образом активную и по существу агрессивную форму защиты злокачественных опухолевых клеток от ЦТА НК-клеток. Более того, показано, что предварительная обработка таких опухолевых клеток индометацином, препятствуя выбросу  $PGE_2$ , делает эти клетки чувствительными к ЦТА НК-клеток [38]. Эти данные показали, что дискретный механизм резистентности высокотуморогенных вариантов ХЭТР к ЦТА НК-клеток определяется их способностью инактивировать ЦТА НК-клеток с помощью  $PGE_2$ , секретируемого в ответ на контактное взаимодействие с этими эффекторами. Парадок-



высказать предположение об общей регуляции этих двух биохимически различных свойств опухолевых клеток. В этом случае отбор *in vivo*  $H_2O_2^R$ -вариантов опухолевых клеток (например, активированными Мф или Нф) мог бы приводить к приобретению ПГЕ<sub>2</sub><sup>S</sup> без участия в этом НК-клеток и, наоборот, НК-клетки могли бы быть ответственны за отбор клеток, экспрессирующих оба свойства.

Остается неясным, предсуществуют ли варианты клеток, экспрессирующие  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, в популяции родительского штамма ХЭТР. Очевидно, однако, что культивирование *in vitro* не выявляет их селективных преимуществ. Оказались неудачными наши попытки отобрать *in vitro* клетки штамма ХЭТР, экспрессирующие  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип с помощью длительного воздействия малых цитотоксичных доз  $H_2O_2$  (неопубликованные данные) или с помощью длительного ко-культивирования опухолевых клеток с резидентными или активированными Мф. В этих опытах приобретение клетками ХЭТР некоторой резистентности к повреждению  $H_2O_2$  не сопровождалось экспрессией ПГЕ<sup>S</sup> [44]. Возможно, это означает, что клеточные варианты, экспрессирующие  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, не предсуществуют в родительской популяции клеток, спонтанно трансформированных *in vitro*, и что экспрессия этого фенотипа скорее представляет собой новое свойство опухолевых клеток, приобретаемое в условиях их роста и естественного отбора *in vivo* (в том числе связанного с ЦТА Мф, НК-клеток и Нф) и обеспечивающее их селективными преимуществами *in vivo* при взаимодействии с этими эффекторами. Корреляция экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа с 30–200-кратным усилением ТГА (сопровождаемой или не сопровождаемой СМА) вариантных линий штамма ХЭТР побудила нас к изучению других моделей трансформации клеток *in vitro*, в первую очередь характеризующихся высоким уровнем ТГА, индуцируемой при трансформации.

## II. ЭКСПРЕССИЯ $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -ФЕНОТИПА КЛЕТКАМИ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫМИ *IN VITRO* ВИРУСОМ САРКОМЫ РАУСА; ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ГЕНА *v-src*

В 60-х годах было впервые показано, а затем подтверждено, что трансформированные *in vitro* вирусом саркомы Рауса (штаммом Шмидт–Руппин) (RSV-SR) клетки мышей, крыс и хомяков характеризуются необычайно высоким уровнем ТГА и нередко СМА [45–47]. Позднее *v-src*-ин-

дуцированный канцерогенез, в том числе у млекопитающих, был охарактеризован как исключительный тип неопластического процесса, имеющий в отличие от других типов канцерогенеза одноступенчатый характер. Механизм одноступенчатого канцерогенеза до настоящего времени все еще остается неясным [48].

Поэтому в свете данных главы I представлялось интересным исследовать свойства клеток, трансформированных RSV-SR *in vitro*, в том числе возможную экспрессию  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, ТГА, СМА и чувствительность к ЦТА Мф и НК-клеток. Для этой цели нормальные эмбриональные клетки Сирийского хомяка мы трансформировали *in vitro* RSV-SR и получили таким образом для исследования четыре независимых штамма *v-src*-трансформантов.

Было обнаружено, что все четыре штамма в процессе трансформации *in vitro* приобрели экспрессию  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, исключительно высокий уровень каталазы, исключительно высокий уровень ТГА и СМА (последняя проявлялась в трех линиях из четырех), высокий уровень резистентности к ЦТА Мф и НК-клеток.  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип этих клеток экспрессировался как на популяционном клеточном уровне, так и на клональном уровне [28, 29, 49, 50]. Некоторые из полученных данных, характеризующих две линии *v-src*-трансформантов, в сравнении с нормальными фибробластами Сирийского хомяка и клетками хомяка, трансформированными спонтанно, представлены в табл. 1.

Неслучайный характер связи между экспрессией  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и высоким уровнем ТГА в клетках RSV-SR-трансформантов был подтвержден в опытах, где антиоксидантная активность ( $H_2O_2^R$ ) этих клеток и ПГЕ<sup>S</sup> были предварительно подавлены *in vitro* отдельно или вместе с помощью нетоксичных доз BCNU и индометацина, а затем *in vivo* был определен уровень ТГА клеток, обработанных и интактных. Такое воздействие с помощью обоих агентов или только BCNU приводило к более чем 150-кратному подавлению ТГА исследуемых клеток; однократное воздействие только индометацином оказалось малоэффективным для подавления ТГА [49].

Необычайно высокий уровень антиоксидантной активности штаммов клеток, трансформированных RSV-SR *in vitro*, оказался в основном обусловленным высокой активностью каталазы, которая в этих клетках была в 1,8–2,5 раза выше, по сравнению с клетками штамма ХЭТР, трансформированных спонтанно, и в 5 раз выше, чем в нормальных фибробластах (табл. 1).

Экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа клетками RSV-SR-трансформантов (так же, как ранее это было показано в отношении отобран-

Таблица 1. Характеристики линий клеток Сирийского хомяка, трансформированных *in vitro* вирусом саркомы Рауса (RSV-SR), по сравнению с нормальными клетками и спонтанно-трансформированными клетками штамма ХЭТР

| Линии клеток     | Трансформация <i>in vitro</i> | Экспрессия <i>in vitro</i>                               |                                                           | Антиоксидантная активность ферментов   |                                         |                                          | ТГА <sup>7</sup><br>(lg TrD <sub>50</sub> ) | СМА <sup>8</sup><br>(+) или (-) |
|------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|
|                  |                               | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>CA</sup> <sup>2</sup> | PGE <sub>2</sub> <sup>S</sup> <sup>3</sup><br>(+) или (-) | каталаза <sup>4</sup><br>(Е на 1 мг Р) | CuZn-СОД <sup>5</sup><br>(МЕ на 1 мг Р) | ГП <sup>6</sup><br>(нмоль/мин на 1 мг Р) |                                             |                                 |
| ХЭФ <sup>1</sup> | —                             | ≥ 10 мин                                                 | —                                                         | 4,0 ± 0,3                              | 1587 ± 42                               | 19,4 ± 0,01                              | —                                           | —                               |
| ХЭТР             | спонтанная                    | > 5 мин                                                  | —                                                         | 8,6 ± 0,6                              | 803 ± 22                                | 67,0 ± 2,2                               | 2,7–3,4                                     | —                               |
| ХЭТ-SR           | } RSV-SR                      | 10–20 с                                                  | +                                                         | 17,7 ± 1,1                             | 320 ± 17                                | 144,6 ± 7,8                              | } 0,5–1,4                                   | —                               |
| ХЭТ-SR-1         |                               | 10–20 с                                                  | +                                                         | 16,3 ± 0,7                             | 293 ± 6                                 | 99,0 ± 7,7                               |                                             | +++                             |

<sup>1</sup> Нормальные фибробласты Сирийского хомяка.<sup>2</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-катаболизирующая активность клеточных экстрактов (мин, с); детали – в [28].<sup>3</sup> PGE<sub>2</sub>-секретирующая активность, (+) или (–) при контактном взаимодействии клеток-мишеней с НК-клетками [28].<sup>4</sup> Определялась спектрофотометрически в ед. на 1 мг белка (по Азби, 1984); детали – в [28].<sup>5</sup> Определялась спектрофотометрически в международных ед. на 1 мг белка (по Бочамп и Фридович, 1971); детали – в [28].<sup>6</sup> Глутатионпероксидаза (ГП) определялась в наномолях на 1 мг белка в 1 мин (по Тнэтзе, 1969); детали – в [28].<sup>7</sup> Туморогенная активность определялась в lg 50%-ной прививочной дозы опухолевых клеток; детали – в [49].<sup>8</sup> Спонтанная метастатическая активность определялась в стандартных тестах (+) или (–); детали – в [49].

ных *in vivo* вариантов ХЭТР) оказалась непосредственно ответственной за резистентность этих клеток к ЦТА Мф и НК-клеток. Предварительная обработка RSV-SR-трансформантов индометацином делала их высокочувствительными к ЦТА НК-клеток [38]. Высокий уровень резистентности *v-src*-трансформантов к ЦТА Мф и НК-клеток особенно удивителен, поскольку эти клетки не проходили отбора *in vivo* и не располагали каким-либо предварительным опытом взаимодействия с этими эффекторами врожденного противоопухолевого иммунитета.

Очевидно, что в случае RSV-SR-трансформантов экспрессия [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>CA</sup> + PGE<sup>S</sup>]-фенотипа, высокий уровень ТГА и приобретение резистентности к ЦТА Мф и НК-клеток определяются трансформирующей активностью *v-src*-гена и независимы от их отбора *in vivo* Мф и/или НК-клетками, как это предполагалось ранее в случае отбора *in vivo* вариантов ХЭТР (см. главу I).

Специфическая роль гена *v-src* и его трансформирующей активности в индукции [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>CA</sup> + PGE<sup>S</sup>]-фенотипа, а также высокого уровня ТГА, СМА и резистентности к ЦТА Мф и НК-клеток стала более ясной в свете следующих опытов. По независимым обстоятельствам (для решения некоторых других задач) два из наших RSV-SR-трансформантов (низкометастатический ХЭТ-SR и высокометастатический ХЭТ-SR-1) были трансфицированы плазмидной ДНК, содержащей активированный ген *N-ras* (*neo*). Как было показано ранее, p21<sup>ras</sup> и pp60<sup>v-src</sup> использу-

ют один сигнальный путь – через фосфатидилинозитол-3-киназу [51, 52]. В исследованиях Тополь и соавт. [53] было показано, что в клетках ХЭТ-SR, трансфицированных *N-ras*, экспрессия *v-src*-гена (mRNA и енолазная активность pp60) была существенно (почти полностью) подавлена, в то время как уровень экспрессии p21<sup>N-ras</sup> стал в 10 и более раз выше. Одновременно с подавлением активности *v-src*-гена *N-ras*-трансфицированные клетки ХЭТ-SR полностью утратили экспрессию [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>CA</sup> + PGE<sup>S</sup>]-фенотипа [54]. В исследованиях *N-ras*-трансфектантов другого штамма – ХЭТ-SR-1, экспрессия pp60<sup>v-src</sup> была подавлена в существенно меньшей степени, а экспрессия гена *N-ras* (p21<sup>ras</sup>) увеличилась всего в 2,0–2,5 раза. В этом случае клетки большинства исследованных трансфицированных клонов сохраняли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>CA</sup>, но утрачивали PGE<sup>S</sup>. Следует подчеркнуть, что *N-ras*-трансфекция клеток, трансформированных RSV-SR, оказалась единственным известным нам условием, ведущим либо к полному подавлению активности *v-src*-гена и в этом случае к полной утрате [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>CA</sup> + PGE<sup>S</sup>]-фенотипа, либо в случае частичного подавления *v-src*-гена и низкой активности трансфицированного *N-ras* – к диссоциации признаков, составляющих [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>CA</sup> + PGE<sup>S</sup>]-фенотип (происходившей всегда только за счет утраты PGE<sup>S</sup>).

Известно, что взаимодействие pp60<sup>v-src</sup> и p21<sup>N-ras</sup> в различных типах клеток-реципиентов может происходить в более чем одной точке сигнального пути, начинающегося с G-белка и

распространяющегося через PI-3 [55]; уровень генетической нестабильности клеток-трансфектантов, вероятно, может влиять на это взаимодействие. Можно предположить, что полное подавление  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа при N-ras-трансфекции клеток ХЭТ-SR связано с начальной частью сигнального пути, выше точки активации PLC (фосфолипазы C), в то время как подавление только  $PGE_2$  при сохранении  $H_2O_2^{CA}$  в N-ras-трансфицированных клетках ХЭТ-SR-1, возможно, связано с взаимодействием  $pp60^{v-src}$  и  $p21^{N-ras}$  в более отдаленном пункте сигнального пути [53, 54]. В любом случае сравнительные данные по полному или частичному подавлению активности v-src-гена в RSV-SR-трансформантах, сопровождаемому в большинстве клонов N-ras-трансфектантов соответственно полным или частичным подавлением  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, свидетельствуют в пользу зависимости экспрессии этого фенотипа в RSV-SR-трансформантах от активности v-src-гена. В последующих наших исследованиях было показано, что трансфекция клеток как штамма ХЭТ-SR, так и штамма ХЭТР генами N-ras и Ha-ras приводит к подавлению их антиоксидантной активности за счет существенного (практически полного) подавления каталазы, постепенно восстанавливаемой на 2–3 циклах отбора *in vivo* [28]. Таким образом, впервые было показано, что характерными биохимическими проявлениями трансформа-

ции клеток *in vitro* геном v-src является, наряду с  $PGE_2^S$ , существенное повышение активности каталазы, в то время как гены N-ras и Ha-ras подавляют оба эти свойства.

По-видимому, имеется только один тип нормальных клеток, экспрессирующих сходный  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, – это активированные Мф, обладающие  $H_2O_2^R$  и способностью к выбросу  $PGE_2$  в ответ на некоторые сигналы [56]. Согласно схеме авторов передача сигнала в активированных Мф после контакта рецептора с лигандом проходит через G-белок, гидролиз PIP<sub>2</sub>, активацию PLC, а затем, возможно, разделяется на два взаимосвязанных участка пути, один из которых ведет к секреции  $PGE_2$  (или LT), а другой – к кислородному взрыву (и его последующему подавлению с помощью  $PGE_2$ ). Упрощенная схема этих событий представлена на рис. 3.

В свете этих данных экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа при активации Мф и стабильная его экспрессия в клетках v-src-трансформантов, а также в злокачественных, отобранных *in vivo* вариантах клеток ХЭТР позволяют предполагать общий механизм регуляции экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, возможно, связанный с активацией c-src-гена. Экспрессия тирозинкиназой активности генов семейства src в активированных Мф, а также в нормальных фибробластах под влиянием таких ростовых факторов, как PDGF, CSF-1 и др., была показана в

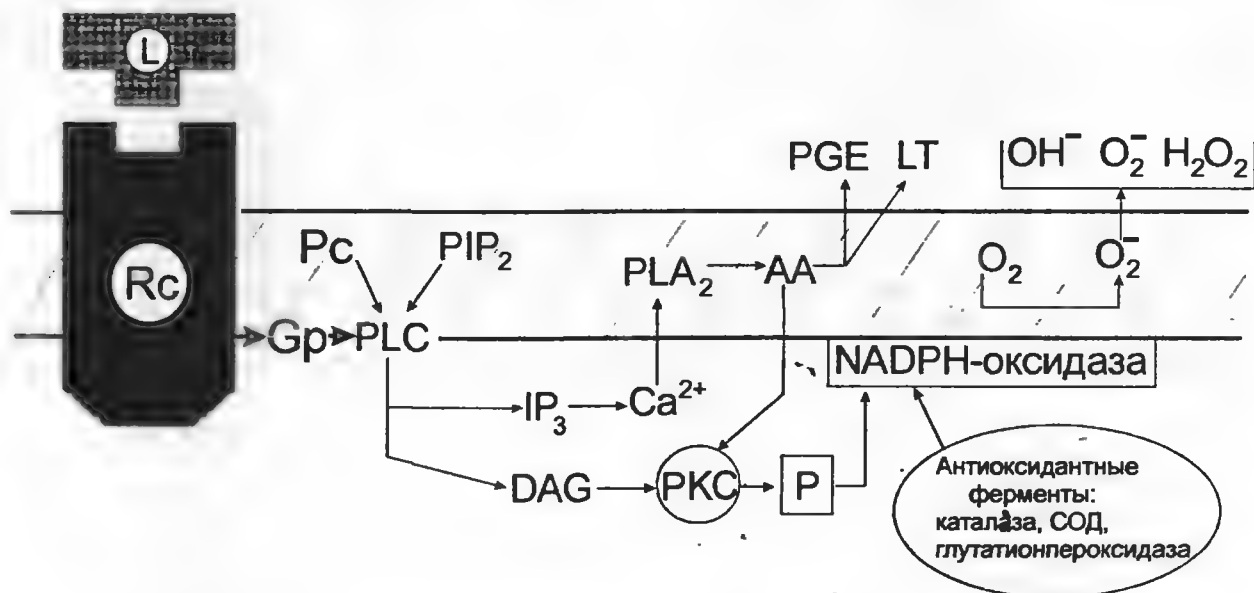


Рис. 3. Модифицированная схема передачи сигнала для двух метаболических взрывов в активированных Мф: выброс  $PGE$  (или LT) и свободных радикалов кислорода, а также инактивации  $H_2O_2$  антиоксидантными ферментами. Принятые сокращения: GP – G-белок, PC – фосфатидилхолин, PLC – фосфолипаза C, DAG – 1,2-диацилглицерол, PLA<sub>2</sub> – фосфолипаза A<sub>2</sub>, PKC – протеинкиназа C, PGE – простагландин E-типа, LT – лейкотриены, AA – арахидоновая кислота [56]



ряде исследований. В последнее время список экзогенных агентов, вызывающих активацию трансмембранных *src*-тирозинкиназных рецепторов, быстро увеличивается [57]. Окислительный и радиационный стрессы, как показано, вызывают активацию генов семейства *src*. Кодрующие SH2- и SH3-домены *c-src* относятся к элементам, контролирующим сигнальные белки цитоплазмы; их сайт-направленный мутагенез может приводить к онкогенной активации *pp60<sup>c-src</sup>* [58–61]. Мутационная активация *pp60 [c-src]* тирозинкиназы, сопровождаемая усилением ТГА, была показана при отборе *in vivo* пре-неопластических клеток Сирийского хомяка, исходно трансформированных *in vitro* спонтанно, а также различными агентами [62]. В последние годы накапливается все больше наблюдений об активации *c-src*-гена в клетках ряда опухолей человека, в частности при раке толстого кишечника, особенно на поздних стадиях опухолевого процесса [63, 64].

Оставалось неясным, насколько экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа специфична для *v-src*-трансформации клеток и обладают ли другие онкогены или супрессорные гены способностью индуцировать экспрессию этого фенотипа в трансформированных *in vitro* клетках. Исследованию этого вопроса была посвящена следующая глава нашей работы.

### III. ТРАНСФОРМИРУЮЩИЕ ГЕНЫ И ОПУХОЛЕВАЯ ПРОГРЕССИЯ *IN VIVO*

В связи с данными глав I и II представлялось интересным исследовать возможную экспрессию  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа клетками того же происхождения (Сирийского хомяка), трансформированными (или трансдуцированными) *in vitro* онкогенами, отличными от *v-src*-гена и различающимися между собой механизмами трансформации. Для этого в большой серии наших опытов была исследована возможная индукция *in vitro* экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа трансформирующими генами LTSV40, E1a и b, Ha-ras, *myc*, *p53<sup>175</sup>* и *bcl-2*, а также уровни ТГА и СМА трансформированных клеток. Такому исследованию был подвергнут ряд родительских клеточных линий, полученных путем трансформации нормальных фибробластов *in vitro* онкогенными вирусами SV40 или BAV-3 либо путем трансдукции клеток штамма ХЭТР генами Ha-ras, *myc*, *p53<sup>175</sup>* и *bcl-2*, а также их отобранные *in vivo* варианты линии клеток.

Показано, что ни одна из исследованных родительских линий клеток, трансформированных (или трансдуцированных) *in vitro* генами LTSV40,

E1a, b, *myc*, Ha-ras, *p53<sup>175</sup>* и *bcl-2*, так же как и ранее исследованные спонтанно-трансформированные *in vitro* клетки штамма ХЭТР, не экспрессировали  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, были низкотуморогенными и неметастазирующими спонтанно. В табл. 2 и рис. 4 суммированы результаты испытания всех перечисленных выше родительских линий клеток, включая *v-src*-трансформанты и клетки штамма ХЭТР. Все исходно не экспрессировавшие  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип родительские линии клеток трансформантов и трансдуцентов были привиты подкожно нормальным животным с целью проведения их через ряд стандартных (рис. 1) циклов естественного отбора *in vivo*. После каждого цикла отбора (в течение 48–60 дней) полученные от индивидуальных животных варианты линии опухолевых клеток (всего более 100 линий) были исследованы вновь на экспрессию  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, ТГА и СМА.

Как видно из представленных данных, все варианты линии клеток приобрели экспрессию  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и существенное (в 30–200 раз) усиление ТГА, иногда сопровождаемое СМА, между вторым и третьим циклами отбора *in vivo* (т.е. суммарно в течение примерно или чуть более 120 дней подкожного роста *in vivo*). Экспрессия СМА клетками ряда клонов, трансформированных LTSV40 и *p53<sup>175</sup>*, была отмечена несколько раньше – уже после двух циклов отбора *in vivo*.

В отличие от всех остальных линий клеток отбор *in vivo* клеток трансдуцента ХЭТР-*bcl-2* был существенно задержан и экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, как и существенное усиление ТГА (и СМА), была выявлена лишь после 4–5 циклов отбора этих клеток *in vivo* (т.е. после 240–300 дней их подкожного роста). Во время первого и частично второго циклов отбора *in vivo* вариантов ХЭТР-*bcl-2* обращало на себя внимание то, что подкожные опухолевые узлы, формируемые этими вариантами, были почти свободны от видимого центрального некроза, очень характерного для опухолей, возникающих при прививке родительских клеток ХЭТР и всех остальных трансдуцентов этих клеток. Однако при последующих циклах отбора *in vivo* зоны некроза в опухолевых узлах ХЭТР-*bcl-2* постепенно увеличивались и стали неотличимы от обширных зон некроза родительских клеток ХЭТР.

В целом представленные в главах I–III данные показали, что после трансформации *in vitro* нормальных хомячковых эмбриональных клеток, возникшей спонтанно или индуцированной генами *v-src*, LTSV40 или E1a;b, а также после трансдукции клеток ХЭТР генами Ha-ras, *myc*, *p53<sup>175</sup>* и *bcl-2*, все клеточные линии (кроме *v-src*-

Таблица 2. Трансформирующие гены, экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и туморогенность опухолевых клеток до и после отбора *in vivo*

| <i>In vitro</i>    |                                                          | Отбор <i>in vivo</i>          |                                                                       |                               |
|--------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| трансформация      | экспрессия $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа (+) или (-) | ТГА (в lg TtD <sub>50</sub> ) | приобретение $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа при отборе (+) или (-) | ТГА (в lg TtD <sub>50</sub> ) |
| v-src              | +                                                        | 0,7–1,4                       | +                                                                     | 0,8–1,4                       |
| Ela;b;             | –                                                        | ≥ 4,3                         | +                                                                     | 1,0–2,4                       |
| LTSV40             | –                                                        | 4,2                           | +                                                                     | 1,5–1,8                       |
| Ha-ras             | –                                                        | 3,7                           | +                                                                     | 2,3–2,6                       |
| myc                | –                                                        | 3,5                           | +                                                                     | 2,2–2,6                       |
| p53 <sup>175</sup> | –                                                        | 3,6                           | +                                                                     | 1,9–2,0                       |
| Спонтан.           | –                                                        | ≥ 3,3                         | +                                                                     | 1,7–2,4                       |
| bcl-2              | –                                                        | 3,3–4,2                       | +                                                                     | 1,4–2,2                       |

Примечание. Обозначения – те же, что в табл. 1.

трансформантов) не экспрессировали  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип и оставались низкотуморогенными. Независимо от типа генов, исходно трансформировавших клетки (кроме v-src-трансформантов), прогрессия опухолей *in vivo* обязательно приводила к замещению родительских, трансформированных *in vitro* клеток опухолевыми клетками, экспрессирующими  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, высокий уровень ТГА и менее постоянно – СМА. Время, необходимое для отбора *in vivo* в подкожно растущих опухолевых узлах клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, было удивительно одинаковым для большинства трансформантов, с одним лишь исключением: трансдукция клеток ХЭТР геном bcl-2 существенно задерживала прогрессию этих опухолей *in vivo* (табл. 2 и рис. 4).

Для объяснения столь существенной задержки в прогрессии *in vivo* опухолей, экспрессирующих ген bcl-2, могут быть рассмотрены следующие три возможности: bcl-2-экспрессирующие клетки в силу своей антиапоптозной активности обладают более высоким (или равным) селективным преимуществом *in vivo* по сравнению с селективными преимуществами редко возникающих в клеточной популяции  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип-экспрессирующих вариантов клеток (в этом случае последние не имеют шансов для отбора *in vivo*, поскольку первые доминируют в данной клеточной популяции); селективные преимущества редко возникающих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$  + bcl-2-вариантов клеток выше, чем у bcl-2-клеток

(в этом случае варианты  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$  + bcl-2 будут постепенно вытеснять родительские bcl-2-клетки из подкожно растущей опухоли (что, по-видимому, и происходит на самом деле); постепенное снижение экспрессии гена bcl-2 *in vivo* и соответственно увеличение шансов для появления и отбора  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -вариантов также остаются вполне возможными. При любой из этих возможностей экспрессия гена bcl-2, по-видимому, препятствует отбору клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, и таким образом (парадоксально!) препятствует опухолевой прогрессии.

Обращают на себя внимание два полярных отклонения в скорости приобретения *in vivo*  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа клетками, трансформированными *in vitro* (рис. 4): v-src-трансформанты (в отличие от всех других исследованных нами трансформантов) приобретают  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип и исключительно высокий уровень ТГА в процессе трансформации клеток *in vitro*, т.е., казалось бы, на нулевой точке опухолевой прогрессии. Последующий опыт жизни клеток, трансформированных v-src *in vivo*, по-видимому, ничего не добавляет к исследуемым свойствам (или добавляет СМА в тех случаях, когда она не экспрессировалась исходно) и, наоборот, bcl-2-трансдуценты приобретают тот же  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип и высокий уровень ТГА (и СМА) только в процессе весьма длительного отбора *in vivo*. Можно предположить, что *in vivo* активность гена bcl-2, подавляя апоптоз,

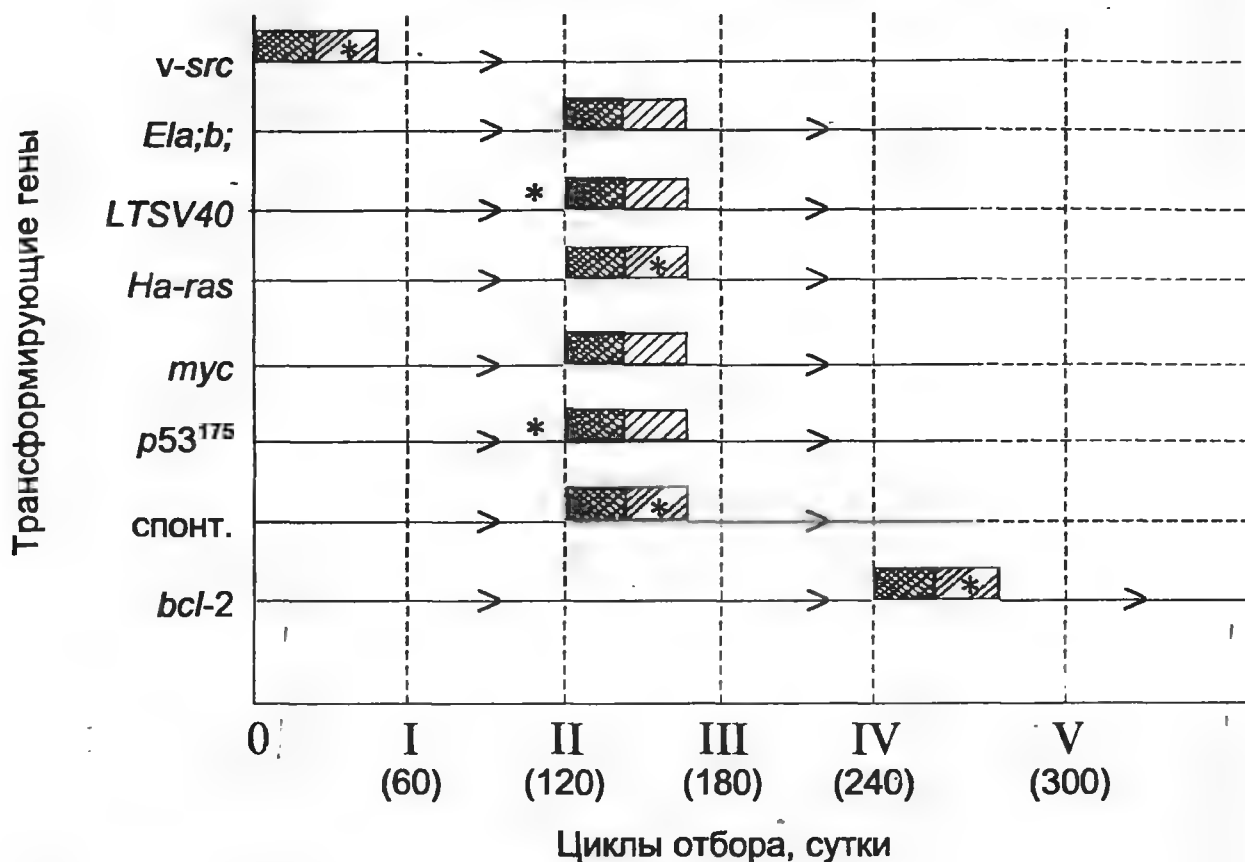


Рис. 4. Трансформирующие гены и прогрессия опухоли *in vivo*: экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип (темные прямоугольники); ТГА ( $\times 50-150$ ) (светлые прямоугольники), \* – СМА

по-видимому конкурирует с отбором клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип и соответственно – с опухолевой прогрессией [29]. Скорость естественного отбора и приобретения экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа *in vivo* клетками, трансформированными генами LTVS40; Ela,b;g; Ha-ras; myc и  $p53^{175}$  *in vitro*, была приблизительно одинаковой и не зависела от типа трансформирующих генов.

В целом полученные данные позволяют рассматривать экспрессию  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа в качестве маркера определенной (предметататической) стадии прогрессии опухолей *in vivo*.

#### IV. ОТБОР КЛЕТОК ПО $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -ФЕНОТИПУ ПРИ ПЕРВИЧНОМ ВИРУСНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

До последнего времени наиболее ранние этапы первичного канцерогенеза *in vivo* и фенотипические изменения опухолевых клеток, воз-

можно, происходящие во время его латентного периода, представлялись недоступными для исследования. Между тем, как подчеркивал Новелл [65], «фундаментальная основа этого начального этапа (канцерогенеза) и степень его специфичности для каждого новообразования остаются основной проблемой исследования рака». Для исследования этой проблемы мы использовали новую возможность – определение  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа в качестве маркера определенной и, по-видимому, одной из наиболее ранних после трансформации стадий опухолевой прогрессии.

Как показано в предыдущих главах, в процессе отбора *in vivo* приобретение экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и параллельно 30–200-кратное усиление ТГА клеток, исходно трансформированных или трансдуцированных *in vitro* различными онкогенами, происходили в подкожно растущих опухолях с поразительно одинаковой скоростью (с двумя описанными выше полярными отклонениями). Это, по-види-

тому, могло означать, что в исходной популяции клеток, трансформированных различными агентами *in vitro*, не было вариантов, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, и/или не было условий для их отбора *in vitro*. В пользу такого предположения свидетельствует то, что вероятность их появления *de novo* и темп отбора в процессе роста опухолей *in vivo* оказались примерно одинаковыми для разных типов трансформантов. Однако оставались неизвестными возможность и сроки приобретения экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа клетками в процессе возникновения первичных опухолей.

Эти вопросы были исследованы нами в опытах на новорожденных Сирийских хомяках на следующих трех моделях первичного вирусного канцерогенеза: RSV-SR-индуцированные опухоли, характеризующиеся очень коротким (несколько дней) латентным периодом и множеством (почти не считываемым числом) сливающихся отдельных опухолевых узлов на месте введения вируса; опухоли, индуцированные обезьяньим аденовирусом SA7(C8), в большинстве случаев характеризующимся лишь несколько более длительным латентным периодом, но существенно меньшим числом [1–6] возникающих первичных новообразований, и опухоли, индуцированные вирусом SV40, характеризующимся длительным латентным периодом и появлением, как правило, не более чем 1–2 опухолевых узлов.

Продолжительность латентных периодов до возникновения первичных опухолей, индуцированных этими вирусами, после их введения новорожденным животным тщательно регистрировалась; как правило, через 15 дней и не позднее 20 дня возникшие индивидуальные первичные опухоли переносили для культивирования

*in vitro*. На уровне 3–5 пассажей *in vitro* культуры первичных опухолей исследовали *in vitro* на экспрессию  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и *in vivo* на ТГА, СМА и чувствительность к ЦТА Мф и НК-клеток.

Результаты этих опытов, представленные в табл. 3, показали, что клетки первичных опухолей, индуцированных RSV-SR, при исследовании через несколько дней после возникновения экспрессировали  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, высокий уровень ТГА и были резистентны к ЦТА Мф и НК-клеток. Таким образом, *in vivo* развитие RSV-SR-индуцированных первичных опухолей, по-видимому, ничего не добавляло к тем свойствам, которые (как это было показано в главе II) были приобретены этими клетками при трансформации *in vitro*. Тем самым для данного типа первичного канцерогенеза установлена независимость экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и других исследуемых свойств от условий роста *in vivo*. В пользу этого предположения свидетельствуют также исключительно короткий латентный период (8–12 дней) RSV-SR-индуцированных первичных опухолей (совпадающий со сроками трансформации клеток *in vitro*) и множественность этих новообразований.

В отличие от них восемь из девяти первичных SA7(C8) опухолей, которые возникали несколько позже (через 24–45 дней после введения вируса новорожденным животным) и соответственно были исследованы через 39–65 дней развития *in vivo*, не экспрессировали  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип и были на 2–3 порядка менее туморогенными (табл. 4). Однако, когда шесть из этих восьми опухолей были привиты животным и, таким образом, прошли один дополнительный цикл отбора *in vivo* (продолжительностью 52–60 дней подкожного роста, т.е. всего после 100–120

Таблица 3. Приобретение  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа в процессе первичного вирусного канцерогенеза

| Онковирусы<br>(онкогены) | Число исследованных<br>первичных опухолей | Латентный<br>период, сутки | Экспрессия<br>$[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -<br>фенотипа (+) или (–) | ТГА<br>(в lg TtD <sub>50</sub> ) | СМА<br>(+) или (–) |
|--------------------------|-------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| RSV-SR<br>(v-src)        | смесь 10                                  | 8–12                       | +                                                               | 0,9–1,4                          | + и –              |
| SA7(C8)<br>(E1a; b)      | 8 (6)*<br>1                               | 24–45<br>110               | – → (+)*<br>+                                                   | 3,5–4,6<br>≤ 3,0                 | –<br>–             |
| SV40<br>(LTSV40)         | 7                                         | 140– >300                  | +                                                               | 1,5–2,2                          | –                  |

Примечание. Обозначения – те же, что в табл. 1.

\* В скобках – дополнительный цикл отбора *in vivo* (субпассаж) шести первичных опухолей SA7(C8); приобретение экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа.

дней их развития *in vivo*) – все они демонстрировали экспрессию  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и примерно 10-кратное усиление ТГА. Можно предполагать, что в конце латентных периодов ранних SA7(C8) первичных опухолей или вскоре после их возникновения, т.е. в период 39–65 дней развития опухолей *in vivo*, некоторые опухолевые клетки в первичных опухолевых узлах (по-видимому, минорная, не определяемая фракция), возможно, уже экспрессировали  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, но для замещения в опухолевом узле этими клетками их родительских клеток 39–65 дней было, по-видимому, недостаточно. В пользу правильности этого предположения свидетельствуют данные, полученные при исследовании девятой первичной SA7(C8)-опухоли, возникшей случайно через 110 дней латентного периода: клетки этой опухоли экспрессировали  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип сразу после возникновения (а также более высокий уровень ТГА) (табл. 3).

Продолжительность латентных периодов семи первичных опухолей, индуцированных SV40, варьировала от 140 до более 300 дней и каждая из этих опухолей экспрессировала  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип после появления (табл. 3). Уровень ТГА первичных опухолей SV40 был примерно на два порядка выше по сравнению как с ранними SA7(C8) первичными опухолями, так и с клетками, трансформированными SV40 *in vitro*, и варьировал от 1,5 до 2,2 lg TrD<sub>50</sub>.

Сроки приобретения  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа клетками индивидуальных SA7(C8) и SV40-индуцированных первичных опухолей позволили приблизительно определить минимальное время, необходимое для замещения *in vivo* в подкожных опухолевых узлах исходных  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип-негативных опухолевых клеток клетками, экспрессирующими данный фенотип. Очевидно, что для этого требуется более 65 дней и, по-видимому, достаточными являются сроки, близкие к 100–140 дням роста опухоли *in vivo*. Таким образом, динамика этого процесса есть функция времени, необходимого для возникновения и отбора *in vivo*  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип-экспрессирующих опухолевых клеток.

В отличие от роста в культуре ткани клеток, трансформированных *in vitro*, возникновение первичных моноклональных опухолей *in vivo*, как правило, представляет собой многоступенчатый процесс, включающий трансформацию клеток, возникновение и отбор новых вариантов опухолевых клеток, обладающих определенными селективными преимуществами для роста *in vivo*. Исключением из этого правила является одноступенчатый тип канцерогенеза, обусловленный RSV-SR. Данные, полученные при исследовании первичного SA7(C8)- и SV40- канцерогенеза, показали, что процесс возникновения и отбора вариантов клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип и соответственно обладающих способностью защищать себя против

Таблица 4. Экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, туморогенность и эффективность иммунного отторжения

| Клеточные линии      | № цикла отбора <i>in vivo</i> | Экспрессия $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа (+) или (-) | Животные          | Трансплантационный тест |                 |                 |                 |                             | Индекс ИЧ* |
|----------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|------------|
|                      |                               |                                                          |                   | 10 <sup>1</sup>         | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> | ТГА (lg TrD <sub>50</sub> ) |            |
| HE-wtSV40 (исходные) | 1                             | –                                                        | нормальные        | 0/5                     | 0/5             | 5/5             | 5/5             | 3,1                         | ≥1,5       |
|                      |                               |                                                          | иммунные (опыт 1) | 0/5                     | 0/5             | 0/5             | 2/5             | ≥4,6                        |            |
|                      |                               |                                                          | нормальные        | 0/6                     | 0/6             | 3/6             | 5/6             | 3,5                         | ≥1,4       |
|                      |                               |                                                          | иммунные (опыт 2) | 0/6                     | 0/6             | 0/6             | 1/6             | ≥4,9                        |            |
| HE-wtSV40-2SC-4      | 3                             | +                                                        | нормальные        | 2/5                     | 5/5             | 5/5             | 5/5             | 1,7                         | 1,6        |
|                      |                               |                                                          | иммунные          | 0/6                     | 2/6             | 4/6             | 4/6             | 3,3                         |            |
| HE-wtSV40-2SC-5      | 3                             | +                                                        | нормальные        | 5/5                     | 5/5             | 5/5             | 5/5             | <1,2                        | ≥1,2       |
|                      |                               |                                                          | иммунные          | 2/5                     | 3/5             | 4/5             | 5/5             | 2,4                         |            |

Примечание. Обозначения – те же, что в табл. 1.

\* Индекс иммуночувствительности (ИЧ) опухолевых клеток определяется как разность lg TrD<sub>50</sub> на иммунных и нормальных животных.



эффекторов врожденного противоопухолевого иммунитета, начинается во время латентного периода и в соответствии с его продолжительностью может быть завершен до его окончания. Моноклональный, как правило, характер возникающих *in vivo* первичных опухолей (а новообразования, индуцированные SV40 и аденовирусами, не являются исключением из этого правила) свидетельствует в пользу того, что случайное появление редких  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип-экспрессирующих вариантов клеток сопровождается их жестким отбором, сохраняющим опухолевые клетки, обладающие селективными преимуществами *in vivo*.

Поразительным исключением из этого сценария являются клетки, трансформированные RSV-SR: трансформация клеток геном *v-src* как *in vitro*, так и *in vivo* совпадает во времени с приобретением ими (без стадии отбора *in vivo*)  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, максимальной ТГА и в ряде случаев даже СМА. Поразительно короткий латентный период (8–12 дней) до появления первичных пальпируемых опухолей, индуцированных RSV-SR, их возникновение у всех инокулированных животных и множественный характер этих новообразований свидетельствуют в пользу неслучайной связи между экспрессией в этих клетках *v-src*-гена,  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и высокого уровня их ТГА. Представляется важным выяснение, в какой степени вероятность и частота возникновения, а также продолжительность латентных периодов различных типов первичных опухолей определяются появлением клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип.

#### V. ЭКСПРЕССИЯ $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -ФЕНОТИПА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА

Из предшествующих данных оставалось неясным, существует ли какая-либо связь между локальной защитой опухолевых клеток, основанной на экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и направленной против эффекторов врожденного противоопухолевого иммунитета, и специфическим противоопухолевым иммунитетом. В частности, нас интересовали два вопроса: возможное влияние специфического противоопухолевого иммунитета на скорость отбора *in vivo* опухолевых клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, и возможное влияние экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа опухолевыми клетками на эффективность их иммунного отторжения в условиях нормального и иммунного организмов.

Для исследования первого из этих вопросов клетки Сирийского хомяка, трансформированные *in vitro* вирусом SV40 (штамм X3-wtSV40), экспрессирующие TSTA (Tumor Specific Transplantation Antigen) и не экспрессирующие  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, были проведены через стандартные циклы отбора *in vivo* на нормальных и SV40-иммунизированных животных. Клетки опухолевых узлов, появляющихся у нормальных и SV40-иммунизированных животных, после каждого цикла отбора *in vivo* переносили *in vitro* в культуру ткани и исследовали на экспрессию  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, а также *in vivo* на ТГА, СМА и TSTA. Экспрессию TSTA определяли по специфической иммуночувствительности опухолевых клеток (разности в значениях ТГА в Ig TrD<sub>50</sub> на иммунных животных по сравнению с нормальными) [68]. Полученные данные показали, что приобретение  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа и высокого уровня ТГА достигается при отборе как на нормальных, так и на иммунных животных приблизительно в одни и те же сроки (между вторым и третьим циклами отбора опухолевых клеток *in vivo*); скорость отбора *in vivo* иммунорезистентных вариантов опухолевых клеток (на иммунных животных) по сравнению с отбором по  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипу существенно отстает и требует в большинстве случаев четырех циклов отбора. Очевидно, что селективное давление эффекторов специфического противоопухолевого иммунитета на TSTA-экспрессирующие опухолевые клетки менее эффективно по сравнению с естественным отбором опухолевых клеток по  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипу и сочетание этих двух видов отбора (на иммунных животных) не ускоряет (и не замедляет) процесс. Эти данные подтверждают, что эффекторы врожденного и специфического противоопухолевого иммунитета осуществляют различные типы селективного давления на опухолевые клетки.

Тем не менее нельзя было исключить возможное влияние экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа опухолевых клеток на их чувствительность к отторжению эффекторами специфического противоопухолевого иммунитета. Для выяснения этой возможности были использованы следующие два подхода.

1. Изучение возможности предотвращения первичных опухолей SV40 с помощью однократной иммунизации зараженных животных вирусом SV40 в различные моменты латентного периода или после его окончания. Результаты шести серий этих опытов представлены на рис. 5, куда также включены приведенные выше (табл. 4) данные о приближительных сроках приобретения  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа во время латент-

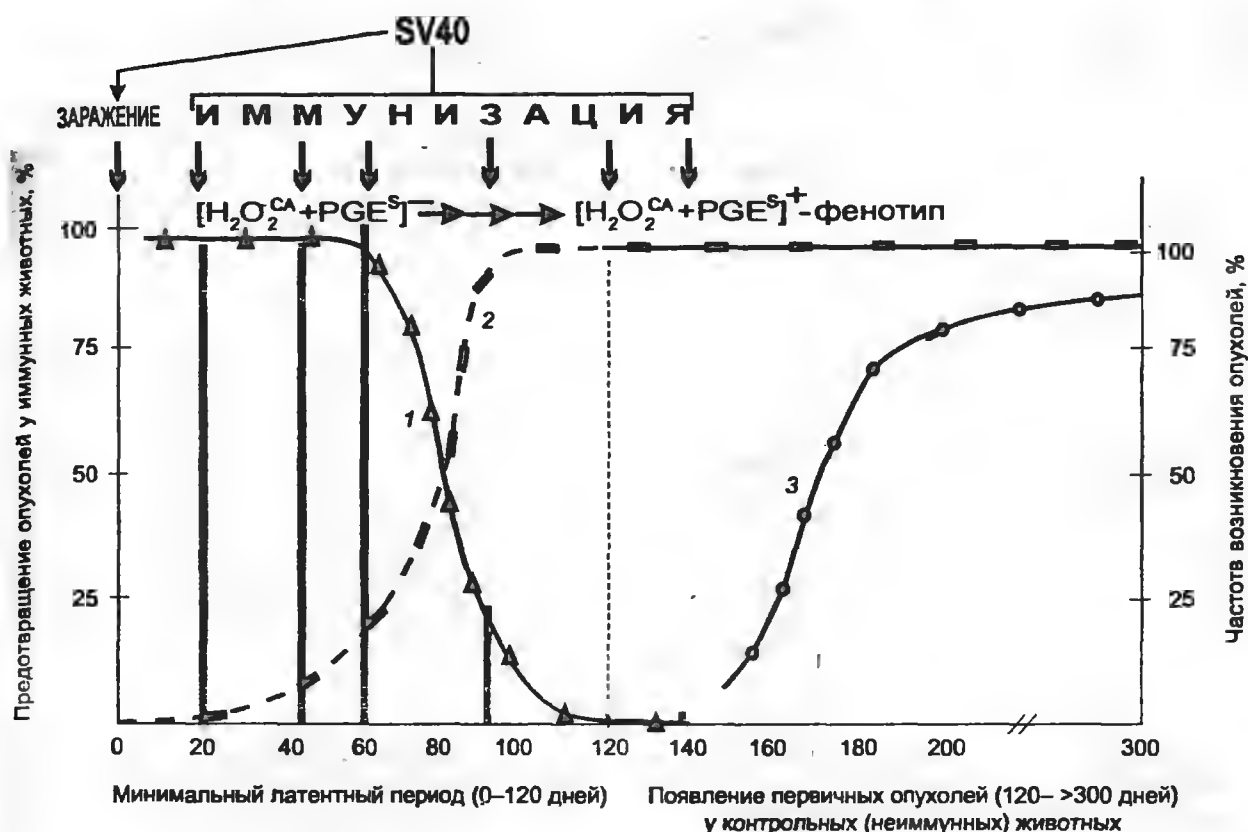


Рис. 5. Влияние отбора опухолевых клеток по  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипу на эффективность специфической иммунизации против первичных опухолей (SV40): 1 – эффективность иммунопрофилактики первичных опухолей SV40 в зависимости от сроков иммунизации; 2 – динамика отбора опухолевых клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип; 3 – динамика возникновения первичных опухолей SV40 у контрольных (неиммунных) животных

ного периода клетками первичных опухолей SV40 и SA7(C8).

Показано, что специфическая иммунизация животных в первые 60–70 дней латентного периода была высокоэффективной и предотвращала появление первичных SV40-опухолей у 90–100% животных (рис. 5, серые столбики). Однако эффективность предотвращения опухолей быстро снижалась, при проведении специфической иммунизации несколько позже, т.е. на 90–100 день латентного периода и была полностью неэффективной, начиная с первого дня после окончания минимального латентного периода (хотя это было задолго до пика возникновения первичных опухолей) [66–68].

Таким образом, период максимальной эффективности превентивной иммунизации против первичных опухолей SV40 (первые 60–70 дней латентного периода) удивительно совпадает с ранней  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип-негативной стадией развития этих опухолей, когда они еще

не приобрели способность защищать себя. И, наоборот, конец этой «наивной» стадии (между 60 и 100 днями латентного периода) совпадает с быстрым снижением эффективности специфической превентивной иммунизации против опухолей SV40 (рис. 5). Естественно, возникает вопрос, какое влияние может оказывать экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа опухолевыми клетками на эффективность реакций отторжения таких клеток в нормальном и иммунном организмах. Для исследования этого вопроса был использован второй (и более прямой) подход.

2. Определение реального числа опухолевых клеток, экспрессирующих или не экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, отторгаемых в организме нормальных и иммунных животных. Для исследования этого родительские клетки (штамма ХЭ-wtSV40), трансформированные *in vitro* вирусом SV40 (низкотуморогенные и не экспрессирующие  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип), и две клеточные линии их прямых потомков, прошед-

шие три цикла отбора *in vivo* на нормальных животных (высокотуморогенные и экспрессирующие  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип), были параллельно испытаны в количественных трансплантационных тестах на группах из 5–6 нормальных и SV40-иммунизированных животных.

Как видно из представленных данных (табл. 4), число родительских клеток, естественно отторгаемых у нормальных животных, составляет  $\sim 10^2$  клеток, в то время как число их  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип-экспрессирующих вариантных линий клеток, отторгаемых у нормальных животных, снижается на 1–2 порядка. Соответственно уровень ТГА этих отобранных *in vivo* линий, т.е. их способность расти при прививке меньшего числа опухолевых клеток, становится существенно более высоким. Реальное число родительских опухолевых клеток, отторгаемых у иммунных животных, близко к  $10^5$ , в то время как число иммунно-отторгаемых клеток вариантных линий их потомков снижается в десятки и сотни раз (до  $10^2$ – $10^3$ ); соответственно уровень ТГА этих клеток существенно повышается. Снижение эффективности иммунного отторжения вариантных линий опухолевых клеток происходит вопреки экспрессии TSTA и сохранению исходного высокого уровня иммуночувствительности (всегда относительной) сравниваемых линий [69].

Таким образом, показано, что клетки отобранных *in vivo* вариантных линий опухолевых клеток отличаются от своих родительских, трансформированных *in vitro* клеток штамма XЭ-wtSV40 по экспрессии  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, существенному снижению реального числа клеток, отторгаемых как у иммунных, так и у нормальных животных, и существенно более высоким уровням ТГА при прививке на нормальных и иммунных животных.

Ранее было показано, что во время латентного периода развития первичных опухолей SV40 инфицированные этим вирусом животные не являются ни толерантными к TSTA SV40, ни иммунными [67, 68]. По-видимому, сопоставление данных рис. 5 и табл. 4 позволяет объяснить быстрое снижение эффективности специфической иммунопрофилактики первичных опухолей SV40 в тех случаях, когда иммунизация проводится во второй половине латентного периода: в это время число  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип-экспрессирующих опухолевых клеток постепенно увеличивается, однако одновременно реальное их число, которое может быть отторгнуто в иммунном организме, снижается в десятки и сотни раз (несмотря на сохраняющуюся иммуночувствительность). Это позволяет предполагать, что приобретаемая с  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипом способность опухолевых клеток к локальной за-

щите против эффекторов врожденного противоопухолевого иммунитета и к их подавлению в очаге опухолевого роста может нарушать взаимодействие и обмен инструктивной информацией между последними и Т-клеточными эффекторами специфического противоопухолевого иммунитета. Прямое локальное подавление Т-хелперов и киллеров опухолевыми клетками, экспрессирующими  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, также не исключено.

Представленные в этой главе обзора данные, по-видимому, имеют отношение к одному из основных и нерешенных вопросов иммунологии опухолей: почему эффективность иммунопрофилактики и иммунотерапии опухолей и метастазов, как правило, оказывается ниже ожидаемой [6–8, 70, 71]. Возможно, что локальные механизмы защиты опухолевых клеток против эффекторов врожденного и специфического противоопухолевого иммунитета, приобретаемые вместе с экспрессией  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа, являются важным и недооцененным фактором низкой эффективности иммунологических воздействий на опухоль *in vivo*.

В заключение представленные в обзоре результаты 10-летней работы нашей лаборатории, посвященные вторичным фенотипическим изменениям трансформированных и опухолевых клеток, свидетельствуют в пользу их закономерного возникновения в процессе естественного отбора и прогрессии опухолей *in vivo*. Эти изменения выражаются в многократном усилении  $H_2O_2$ -катаболизирующей ( $H_2O_2^{CA}$ ) (антиоксидантной) активности опухолевых клеток и в одновременном приобретении нового дискретного признака – способности к немедленному выбросу простагландина  $E_2$  ( $PGE^S$ ) при контактном взаимодействии с НК-клетками и Мф. Одновременное приобретение *in vivo* этих двух биохимически различных признаков опухолевых клеток было установлено при сравнении ряда родительских линий клеток Сирийского хомяка, трансформированных *in vitro* различными агентами, и более 100 клеточных линий их потомков, прошедших отбор *in vivo*. Показано, что экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа обеспечивает клетки как перевиваемых, так и первичных опухолей механизмами активной локальной защиты против ЦТА Мф, НК-клеток, Нф и Т-лимфоцитов. Это приводит к существенному увеличению вероятности их выживания *in vivo* и соответственно уровня ТГА и подавлению эффективности их специфического и неспецифического отторжения *in vivo* эффекторами иммунитета хозяина. Экспрессия  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа показана нами также для культивируемых *in vitro* клеток ряда линий рака человека (данные не представлены).

Казалось бы, наиболее очевидная интерпретация механизма отбора *in vivo* редких вариантов опухолевых клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип позволяет связать его с прямым цитотоксическим действием эффекторов врожденного противоопухолевого иммунитета – Мф, Нф и НК-клетками. Однако серия опытов с клетками, трансформированными *v-src*-геном *in vitro* (или *in vivo*), возможно, свидетельствует в пользу более сложной картины событий, ведущих к появлению  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип-экспрессирующих клеток.

Продемонстрированные в этой серии опытов специфическая роль *v-src*-гена в индукции  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа при трансформации нормальных клеток вирусом саркомы Рауса, неспособность других исследованных нами трансформирующих генов (в том числе генов-супрессоров и *bcl-2*) индуцировать экспрессию этого фенотипа и обязательный характер отбора *in vivo* клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, в новообразованиях иного (т.е. не связанного с *v-src*-геном) онкогенеза *in vivo*, по-видимому, позволяют предполагать, что опухолевые клетки, экспрессирующие  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, возникают *de novo*, в связи со случайными повреждениями ДНК трансформированных и опухолевых клеток, в частности продуктами ЦТА Мф, Нф и НК-клеток. Одним из многих возможных последствий такого повреждения может быть активация *c-src*-гена (или других генов семейства *src*) и соответственно – экспрессия редкими вариантами опухолевых клеток специфичного для *v-src*-трансформантов

$[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотипа; селективные преимущества *in vivo* опухолевых клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, создают условия для выживания, роста и постепенного замещения исходных (не экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип) клеток их потомками, экспрессирующими этот фенотип. На этой второй стадии решающую роль в отборе опухолевых клеток, по-видимому, играют цитотоксические эффекторы системы врожденного иммунитета хозяина. Таким образом, *in vivo*, возникновению *de novo* и отбору опухолевых клеток, экспрессирующих  $[H_2O_2^{CA} + PGE^S]$ -фенотип, возможно, предшествует активация определенных регуляторных клеточных генов, специфичная для *v-src*-трансформированных клеток. Такие *src*-подобные изменения опухолевого фенотипа *in vivo*, возможно, являются одними из наиболее ранних (предметататических) вторичных трансформаций клеток опухолей различной этиологии, функционально необходимых для их выживания *in vivo* при естественном отборе и прогрессии.

Работа выполнена при поддержке программы «Государственные научно-технические приоритеты» (гранты № 47, 46, 22), Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 93-04-20708, 96-04-48054, 99-04-48358), а также гранта Международного фонда Сороса (№ J3Z100). Автор сердечно благодарит Г.И. Абелева и А.Д. Альштейна за ценные замечания и обсуждение отдельных работ, представленных в обзоре, а также Н.А. Дьякову за большую помощь в подготовке рукописи к печати.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Klein, G. (1975) in *Immunology of Tumor-Host Relationship* (Smith, R.T., and Landy, M., eds), Academic Press Inc., N.Y., pp. 201–213.
- Old, L.J. (1981) *Cancer Res.*, 47, 261–275.
- Alexander, P., and Eccles, S. (1984) in *Cancer Invasion and Metastasis: Biological and Therapeutic Aspects* (Nicolson, G.L., and Milas, L., eds), Raven Press, N.Y., pp. 293–308.
- Дейчман Г.И. (1984) *Итоги науки и техники. Сер. Онкология*, т. 13, ВИНТИ, Москва, с. 46–97.
- Deichman, G.I. (1988) *Cancer Surveys*, 7, 675–690.
- Schrieber, H. (1993) in *Fundamental Immunology*, 3rd ed. (Paul, W.E., ed.), Raven Press, N.Y., pp. 1143–1178.
- Klein, E., and Mantovani, A. (1993) *Curr. Opin. Immunol.*, 5, 714–718.
- Boon, T., Cerrottini, J.-C., van den Eynde, B., van den Bruggen, P., and van Pel, A., (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12, 337–366.
- Weinberg, R. (1989) *Cancer Res.*, 49, 3713–3721.
- Janeway, C.A., and Travers, P. (1997) *Immunobiology*, 3rd ed. Current Biology Ltd., Garland Publishing Inc., N.Y.–London.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997) *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 4–9.
- Bandelac, A., and Fearon, D.T. (1997) *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 1–3.
- Fearon, D.T., and Locksley, R.M. (1996) *Science*, 272, 50–54.
- Sniderman, R., and Pike, M.C. (1976) *Science*, 192, 370–372.
- Gorelik, E., Fogel, M., Segal, A., and Feldman, M. (1979) *J. Natl. Cancer Inst.*, 63, 1397–1404.
- Gorelik, E., Feldman, M., and Segal, S. (1982) *Cancer Immunol. Immunother.*, 12, 105–109.
- Grönberg, A., Kiessling, R., Ericksson, E., and Hansson, M. (1981) *J. Immunol.*, 127, 1734–1739.
- Yamashina, K., Fulton, A., and Heppner, G. (1985) *J. Natl. Cancer Inst.*, 75, 765–770.
- Patek, P.O., Lin, Y., Collins, J.L., and Cohn, M. (1986) *J. Immunol.*, 136, 741–745.
- Nathan, C.F., Arrick, B.A., Murray, H.W., de Santia, N.M., and Cohn, Z.A. (1981) *J. Exp. Med.*, 153, 766–782.
- Adams, D.O., and Nathan, C.F. (1983) *Immunol. Today*, 4, 166–169.
- Droller, M., Schneider, M., and Perlman, P. (1979) *Cell. Immunol.*, 39, 165–177.

23. Brunda, M.J., Herberman, R.B., and Holden, H.T. (1980) *J. Immunol.*, **124**, 2682–2687.
24. Fulton, A.M. (1984) *Int. J. Cancer*, **33**, 375–379.
25. Young, R., and Knies, S. (1984) *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**, 919–922.
26. Deichman, G.I., and Vendrov, E.L. (1986) *Int. J. Cancer*, **37**, 401–409.
27. Deichman, G.I., Kluchareva, T.E., Matveeva, V.A., Kushlinsky, N.E., Bassalyk, L.S., and Vendrov, E.L. (1989) *Int. J. Cancer*, **44**, 904–907.
28. Deichman, G.I., Kashkina, L.M., Mizzenina, O.A., Gorojanskaya, E.G., Nikiforov, M.A., Gudkov, A.V., Dyakova, N.A., Komelkov, A.V., Prilutskaya, M.O., Kushlinsky, N.E., and Tatosyan, A.G. (1996) *Int. J. Cancer*, **66**, 747–752.
29. Deichman, G.I., Matveeva, V.A., Kashkina, L.M., Dyakova, N.A., Uvarova, E.N., Nikiforov, M.A., and Gudkov, A.V. (1998) *Int. J. Cancer*, **75**, 277–283.
30. Kluchareva, T.E., Matveeva, V.A., and Kushlinsky, N.E. (1992) *Immunol. Lett.*, **33**, 239–246.
31. Ключарева Т.Е., Матвеева В.А. (1983) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **10**, 86–89.
32. Ключарева Т.Е., Матвеева В.А. (1985) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **6**, 732–734.
33. Ключарева Т.Е., Матвеева В.А., Бассалык Л.С., Кушлинский Н.Е. (1988) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **2**, 204–206.
34. Матвеева В.А., Ключарева Т.Е., Уварова Э.Н. (1993) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **2**, 193–194.
35. Ключарева Т.Е., Матвеева В.А., Кашкина Л.М., Кушлинский Н.Е., Бассалык Л.С., Прилуцкая М.О. (1989) *Эксперим. онкол.*, **11**, 53–56.
36. Лавникова Н.А., Бурделя Л.Г. (1990) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **109**, 954–956.
37. Burdelya, L.G. (1997) *Neoplasma*, **44**, 31–35.
38. Ключарева Т.Е., Матвеева В.А., Уварова Э.Н. (1990) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **9**, 308–310.
39. Deichman, G.I., Kluchareva, T.E., Kashkina, L.M., and Matveeva, V.A. (1979) *Int. J. Cancer*, **23**, 571–584.
40. Hahne, M., Rimoldi, D., Schröter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J.-C., and Tschopp, J. (1996) *Science*, **274**, 1363–1366.
41. Walker, P.R., Saas, P., and Dietrich, P.-Y. (1997) *J. Immun.*, **158**, 4521–4524.
42. von Reyher, U., Strater, J., Kittstein, W., Gschwendt, M., Krammer, P.H., and Moller, P. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 526–534.
43. O'Connel, J., Bennet, M.W., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., and Shanahan, F. (1999) *Nature Med.*, **5**, 267–268.
44. Volpe, E.A. (1992) *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **11**, 109–122.
45. Svoboda, J. (1964) *Natl. Cancer Inst. Monograph*, **17**, 277–298.
46. Alström, C.G. (1964) *Natl. Cancer Inst. Monograph*, **17**, 299–317.
47. Obukh, J.B., Kryukova, I.N., Biryulina, T.I., and Kuznetsova, N.N. (1969) *Int. J. Cancer*, **4**, 799–808.
48. Varmus, H. (1984) *Annual Rev. Genet.*, **18**, 553–612.
49. Deichman, G.I., Kashleva, E.A., Kluchareva, T.E., and Matveeva, V.A. (1989) *Int. J. Cancer*, **44**, 908–910.
50. Кашлева Е.А., Матвеева В.А., Уварова Э.Н., Ключарева Т.Е. (1990) *Эксперим. онкол.*, **12**, 32–34.
51. Sjolander, A., Yamamoto, K., Huber, B.E., and Larenha, E.G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 7908–7912.
52. Fukui, Y., and Hanafusa, H. (1991) *Mol. Cell Biol.*, **11**, 1972–1979.
53. Topol, L.Z., Kisseljova, N.P., Gutierrez, M.L., Deichman, G.I., Musatkina, E.A., Shtutman, M.S., Zakamaldina, T.Z., Blair, D.G., and Tatosyan, A.G. (1993) *Mol. Carcinogen.*, **8**, 167–176.
54. Deichman, G.I., Topol, L.Z., Kluchareva, T.E., Matveeva, V.A., Zakamaldina, T.A., Uvarova, E.N., and Tatosyan, A.G. (1992) *Int. J. Cancer*, **51**, 903–908.
55. Yu, C.-L., Tsai, M.N., and Stacey, D.W. (1988) *Cell*, **52**, 63–71.
56. Hamilton, T.A., and Adams, D.O. (1987) *Immunol. Today*, **3**, 151–158.
57. Brown, M.T., and Cooper, J.A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1287**, 121–149.
58. Hirai, H., and Varmus, H.E. (1990) *Mol. Cell Biol.*, **10**, 1307–1318.
59. Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., and Powson, T. (1991) *Science*, **252**, 668–674.
60. Ralston, R., and Bishop, J.M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7845–7849.
61. Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., Zhou, X.M., Foster, D., Brugge, J.S., and Sukhatme, V.P. (1995) *Nature*, **375**, 577–581.
62. Kanner, S.B., Parsons, S.J., Parsons, J.T., and Gilmer, T.M. (1988) *Oncogene*, **2**, 327–335.
63. Littrell, D.K., Lee, A., Lansing, T.J., Crosby, R.M., Jung, K.D., Willard, D., Luther, M., Rodrigues, M., Berman, J., and Gilmer, T.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 83–87.
64. Irby, R.B., Weiguang Mao, Coppola, D., Kang, J., Laubeau, J.M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D.J., Jove, R., and Yeatman, T.J. (1999) *Nature Gen.*, **21**, 187–190.
65. Nowell, P.S. (1986) *Science*, **194**, 23–28.
66. Deichman, G.I., and Kluchareva, T.E. (1964a) *Nature (Lnd.)*, **4937**, 1126–1128.
67. Deichman, G.I., and Kluchareva, T.E. (1964b) *Virology*, **24**, 131–137.
68. Deichman, G.I. (1969) *Adv. Cancer Res.*, **12**, 101–136.
69. Deichman, G.I., Dyakova, N.A., Kashkina, L.M., Matveeva, V.A., and Uvarova, E.N. (1999) *Immunol. Lett.*, **701**, 37–42.
70. Kedar, E., and Klein, E. (1992) *Adv. Cancer Res.*, **59**, 245–294.
71. Wick, M., Dubey, P., Koepfen, H., Siegel, C.T., Fields, P.E., Chen, L., Bluestone, J.A., and Schreiber, H. (1997) *J. Exp. Med.*, **186**, 229–238.



## NATURAL SELECTION AND EARLY PHENOTYPIC CHANGES OF TUMOR CELLS *IN VIVO*: ACQUISITION OF NEW DEFENCE MECHANISMS

G.I. Deichman

*Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,  
Russian Academy of Medical Sciences,  
Kashirskoye sh. 24, Moscow, 115478; fax: (095) 324-1205,  
E-mail: antitum@space.ru*

Submitted October 5, 1999

The review summarizes the results obtained during the last 10 years in the laboratory of author and collaborating laboratories. Its aim is to attract attention of experimentators to the discrete biochemical mechanisms of malignant tumor cells defence against the effectors of innate antitumor immunity. The following findings were demonstrated: the new regularly arising tumor cell variants selected during *in vivo* tumor progression, are characterized with high  $H_2O_2$ -catabolizing ( $H_2O_2^{CA}$ ), antioxidant activity and with ability to release prostaglandins of  $E_2$  type ( $PGE_2^S$ ) immediately in contact with NK cells, Mph and Nph; expression of [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ] phenotype is providing tumor cells with two mechanisms of effective local defence against the effectors of the innate, and of the specific antitumor immunity. This effect is expressed in the 10–100 times decreased effectiveness of tumor cells rejection in normal and immune animals; *in vitro* cells transformation, spontaneous, or induced by oncogenes LTV40, E1a;b, Ha-ras, myc, as well as with p53<sup>175</sup> and bcl-2 is not leading to the expression of [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ] phenotype. However, during the subsequent *in vivo* growth of above-mentioned transformants, tumor cells expressing [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ] phenotype and the 30–200 times increased level of tumorigenicity, (followed, or not followed with spontaneous metastasizing activity) are selected; in contrast, *in vitro* transformation of normal cells with v-src gene is leading to expression of [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ] phenotype; the data in favour of the determining role of v-src gene in the expression of [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ] phenotype are presented; in the primary viral-induced carcinogenesis [SV40; SA7(C8) and RSV-SR] the natural selection of cells expressing [ $H_2O_2^{CA} + PGE^S$ ] phenotype is beginning during the latent period and this process may be completed to the moment of the primary tumors appearance.

**KEY WORDS:** transformation, carcinogenesis, *in vivo* tumor progression, antioxidant and  $PGE_2$ -releasing activity of tumor cells, mechanisms of tumor cells defence, innate and specific antitumor immunity.

УДК 576.385.5

## КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

### Обзор

© 2000 г. А.А. Ставровская

*Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115478 Москва, Каширское ш., 24; факс: (095) 324-1205,  
электронная почта: Alla@Astavrovskaya.home.bio.msu.ru*

Поступила в редакцию 17.09.99

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – это невосприимчивость популяции клеток опухоли одновременно к целому ряду химиотерапевтических препаратов разного химического строения и с разным механизмом действия на клетку. МЛУ представляет собой серьезное препятствие на пути успешного лечения злокачественных новообразований. Исследования последних лет показали, что молекулярные механизмы МЛУ множественны и лекарственная устойчивость клетки может определяться включением различных механизмов, характеризующих разные этапы осуществления токсического действия химиопрепарата на клетку – от ограничения накопления лекарства внутри клетки до отмены программы гибели клетки, индуцируемой веществом. Нередко в клетке включается несколько защитных механизмов, однако чаще всего преобладает какой-то один механизм. Наиболее изученными механизмами, чья клиническая значимость при некоторых формах новообразований выявлена, являются активация трансмембранных транспортных белков, выводящих различные вещества из клетки (к ним принадлежит Р-гликопротеин); активация ферментов системы глутатиона, детоксицирующей препараты; изменения генов и белков, контролирующих апоптоз и выживаемость клетки (в первую очередь p53 и Bcl-2).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** множественная лекарственная устойчивость, механизмы защиты клетки, Р-гликопротеин, глутатион-S-трансферазы, апоптоз, p53, Bcl-2.

Исследование устойчивости опухолевых клеток к цитостатическим лекарственным препаратам необходимо для понимания механизмов защиты клетки от повреждений. Изучение резистентности малигнизированных клеток к химиотерапии важно и для практической онкологии, поскольку с ней нередко связывают неудачи лечения злокачественных новообразований. Неэффективность терапии может быть обусловлена не только изменениями опухолевых клеток, но и целым рядом других причин, по которым препарат не доходит до клетки в адекватной и активной форме (особенности фармакокинетики лекарств). Здесь мы разберем основные механизмы, обуславливающие резистентность собственно клеток к химиопрепаратам, не останавливаясь на проблемах фармакокинетики лекарственных веществ.

В табл. 1 в общей форме представлены основные этапы реализации в клетке повреждающего действия лекарственного препарата – от проникновения вещества в клетку до ее программируемой гибели – апоптоза. Апоптоз вызывает большинство химиопрепаратов [1]. Перечень изменений, приводящих к лекарственной устойчивости, свидетельствует о том, что клетки млекопитающих обладают возможностью

прерывать путь реализации повреждения на любом этапе, и показывает, что механизмы резистентности популяций опухолевых клеток к токсическим воздействиям разнообразны.

Современная химиотерапия обычно использует комбинацию лекарственных средств, принадлежащих к разным классам и действующих на разные клеточные мишени [2]. Примеры некоторых химиотерапевтических препаратов и их мишеней в клетке приведены в табл. 2. Очевидно, что весьма разные лекарства повреждают в клетке разнообразные мишени. Проблемы комбинированной химиотерапии опухолей и множественность мишеней для разных препаратов выдвигают на первый план множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток. МЛУ – это устойчивость клетки не к одному, а к нескольким (или многим) препаратам с разным механизмом действия и разного химического строения. МЛУ была впервые обнаружена в опытах с культивируемыми клетками [3]. Было показано, что воздействие на культуры клеток одного препарата может привести к возникновению популяции, резистентной одновременно ко многим другим веществам, с которыми клетки не встречались (перекрестная устойчивость).

Таблица 1. Основные механизмы лекарственной устойчивости опухолевых клеток

| № п/п | Основные этапы реализации цитостатического действия лекарственных препаратов | Изменения, приводящие к лекарственной устойчивости                                                                               | Механизмы лекарственной устойчивости (примеры)                                              |
|-------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.    | накопление препарата в клетке<br>↓                                           | снижение накопления препарата в клетке                                                                                           | активация белков-транспортеров (Р-гликопротеин, MRP и др.)                                  |
| 2.    | активация или сохранение активности препарата внутри клетки<br>↓             | инактивация препарата или отсутствие его активации                                                                               | активация ферментов системы глутатиона, секвестрация препарата во внутриклеточных везикулах |
| 3.    | повреждение мишени препарата<br>↓                                            | изменение мишени, повышенная репарация повреждений                                                                               | мутации генов топоизомераз, увеличение степени репарации ДНК                                |
| 4.    | блок клеточного цикла и/или гибель клетки<br>⊕                               | отмена апоптоза или блока клеточного цикла, возникающих в ответ на действие цитостатика: активация генов, контролирующих апоптоз | мутации гена p53, активация гена BCL-2                                                      |

Таблица 2. Основные классы химиотерапевтических препаратов

| Основные классы химиотерапевтических препаратов | Примеры лекарственных препаратов данного класса                              | Некоторые механизмы действия                                   | Примеры мишеней действия препаратов                |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Алкилирующие соединения                         | мелфалан, циклофосфамид, хлорамбуцил, цисплатин                              | связывание с ДНК, образование разрывов и сшивок в молекуле ДНК | молекула ДНК                                       |
| Противоопухолевые антибиотики                   | дактиномицин, даунорубин, доксорубин                                         | ингибирование топоизомераз                                     | топоизомеразы II и I                               |
| Препараты растительного происхождения           | винка-алкалоиды (винбластин), подофиллотоксины (этопозид), таксаны           | деполимеризация микротрубочек, влияние на веретено деления     | цитоплазматические микротрубочки, веретено деления |
| Антиметаболиты                                  | метотрексат, фторурацил, цитозар, 5-азациитидин, 6-меркаптопурин, гемцитабин | ингибирование ферментов, необходимых для синтеза ДНК и РНК     | дигидрофолатредуктаза, тимидилатсинтетаза и др.    |

МЛУ, разумеется, не обязательно возникает в результате воздействия лекарств на клетки. Она нередко связана с типом дифференцировки опухолевых клеток или с их локализацией в организме. Это так называемая «природная» МЛУ (устойчивость, исходно свойственная данным клеткам). Примером могут служить опухоли мозга, резистентные к химиотерапии из-за гематоэнцефалического барьера. Природная или предшествующая МЛУ может определяться также генетическим изменением, вызвавшим данное новообразование. Показано, например, что хромосомная транслокация 9;22 и связанное с ней появление сливного белка BCR/ABL, определяющие хронический миелолейкоз, приво-

дят к отмене апоптоза и, следовательно, могут определять МЛУ [4]. Другие примеры этого типа МЛУ мы приводим ниже, при обсуждении роли гена p53 в МЛУ опухолевых клеток (см. раздел 4). При природной МЛУ все клетки новообразования устойчивы к терапии.

Приобретенная МЛУ может возникать в результате химиотерапии. В популяциях опухолевых клеток в результате воздействия цитостатика могут появиться редкие генетические варианты резистентных клеток, которые впоследствии размножаются, в том случае, если получают селективное преимущество. Селективное преимущество клеткам обеспечивает не обязательно лекарственная устойчивость, но и другие призна-

ки клетки, такие как ускоренное размножение, изменение чувствительности к факторам роста и пр. Эти факторы влияют на селекцию клеток лекарственными препаратами. Существенный интерес представляют также так называемые «адаптационные изменения», в условиях которых большинство клеток популяции оказывается устойчивым к лечению за счет временной активации защитных механизмов клеток. Эти изменения и связь их с развивающейся впоследствии стабильной МЛУ изучены мало. Далее мы разберем основные механизмы, определяющие МЛУ.

### 1. ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СНИЖЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ВНУТРИ КЛЕТКИ

*A priori* снижение накопления лекарства в клетке может быть результатом как ограничения поступления в клетку лекарственных препаратов, так и увеличения выведения их из клетки. Поскольку подавляющее большинство химиотерапевтических препаратов проникает в клетку путем простой диффузии через плазматическую мембрану, поступление вещества в клетку может измениться в том случае, если меняется структура клеточной мембраны. Действительно, электронно-микроскопические исследования и анализ липидов мембран клеток с МЛУ выявили отличия некоторых резистентных клеток от чувствительных [5]. Обнаруженные модификации могли как изменять прохождение некоторых препаратов через мембрану, так и оказывать влияние на передачу сигналов, определяющих апоптоз. Однако сведений относительно данного механизма — изменений поступления лекарств в клетку, немного и на первый план уже давно выступил другой механизм — выброс (откачка) токсических веществ из резистентных клеток.

Выброс веществ из клеток связан с функционированием транспортных белков, к которым принадлежат Р-гликопротеин (Pgp), транспортеры семейства MRP, а также некоторые другие белки (табл. 3). Исследования Pgp проводятся давно (более 25 лет) и в этой области накоплено значительное количество фактов, которые позволяют рассмотреть на примере МЛУ, обусловленной Pgp (Pgp-МЛУ), проблемы, которые еще ждут своего решения при исследовании других механизмов МЛУ. В связи с этим мы остановимся на Pgp подробнее.

**1.1 Множественная лекарственная устойчивость, обусловленная Р-гликопротеином (Pgp).** Pgp — общие сведения, функциональная активность. Активность Pgp определяет резистент-

Таблица 3. Некоторые транспортные белки, определяющие множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток и кодирующие их гены

| Белок                                      | Молекулярная масса, кДа | Ген человека | Хромосомная локализация |
|--------------------------------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|
| Р-Гликопротеин (Pgp)                       | 140–170                 | <i>MDR1</i>  | 7q21.1                  |
| MRP                                        | 190                     | <i>MRP1</i>  | 16p13.1                 |
| LRP                                        | 110                     | <i>LRP</i>   | 16p11.2                 |
| VMAT (везикулярный транспортер моноаминов) | 62                      | <i>VMAT</i>  | 10q26.1                 |
| ARX                                        | 72                      | <i>ARX</i>   | 1p22                    |

ность опухолевых клеток ко многим противоопухолевым лекарствам (антрациклиновым антибиотикам, алкалоидам растительного происхождения, в частности к винка-алкалоидам, подофиллотоксинам, таксанам и др.), а также ко многим другим веществам — флуоресцентным красителям, бромистому этидию, пуромицину, грамицидину Д и др. Бытует шутка, что этот белок и белок MRP (см. ниже) определяют резистентность клеток к половине веществ из каталога «Sigma».

Pgp — крупный трансмембранный белок с молекулярной массой ~170 кДа, состоящий из двух одинаковых частей, каждая из которых включает шесть гидрофобных трансмембранных участков (рис. 1). Это позволяет считать, что молекула Pgp 12 раз пересекает плазматическую мембрану клетки. Молекула Pgp имеет два сайта связывания с АТФ (рис. 1), что свидетельствует об энергозависимости функционирования белка. Одна из наиболее популярных в течение длительного времени гипотез предполагает, что молекула цитостатика связывается с соответствующим сайтом Pgp внутри липидного бислоя плазматической мембраны и благодаря энергии, полученной в результате гидролиза АТФ, выбрасывается наружу. Действительно, лекарственные препараты в большей степени связываются с мембранами резистентных клеток, чем чувствительных, а в экспериментах было показано, что препараты связываются в геле с белком с молекулярной массой 170 кДа [6]. Было обнаружено также, что меченые лекарства, например, винбластин, и флуоресцентные красители, которые являются также субстратами

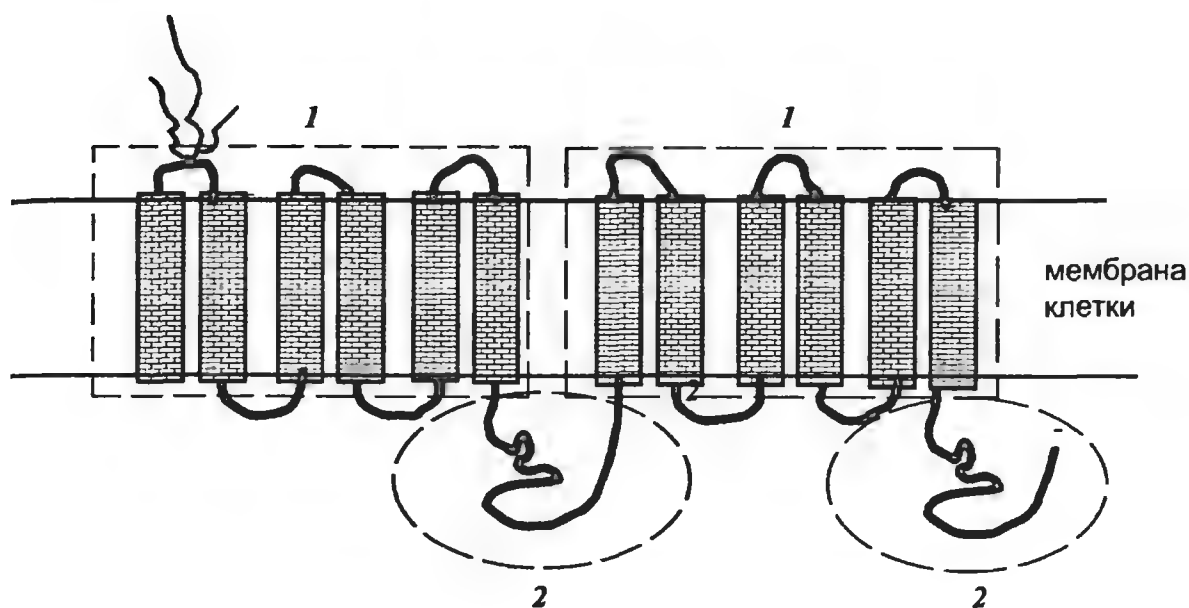


Рис. 1. Схема строения белка множественной лекарственной устойчивости Р-гликопротеина (Рgp): 1 – домены, содержащие трансмембранные участки (обозначены прямоугольниками), 2 – АТР-связывающие домены (обведены овалом) (по работе [11])

Рgp, гораздо быстрее выводятся из гиперэкспрессирующих Рgp резистентных клеток [6]. В последнее время получены данные, свидетельствующие в пользу того, что Рgp работает как флипаза, перемещающая связанные им субстраты из внутреннего липидного слоя мембраны клетки в наружный или во внешнюю среду [7].

Существуют разные методы, позволяющие тестировать функциональную активность Рgp как насоса, выводящего вещества из клетки. Активность Рgp может быть оценена по степени накопления меченого лекарства (например, [ $^3\text{H}$ ] винбластина) или флуоресцирующего препарата (например, даунорубина) клетками, а также по степени накопления или по скорости выброса веществ, например флуоресцентных красителей, субстратов Рgp (родамина-123 и др.) клетками [8, 9]. При этом применяют также модуляторы активности Рgp, желательны в наибольшей степени специфичные для него (например, РSC833 или верапамил). Накопление любого вещества (субстрата Рgp) снижено в клетках с повышенной функцией Рgp. Это вещество быстрее выходит из клеток с Рgp-МЛУ, ингибитор функции Рgp тормозит процесс выброса препарата [10].

Р-Гликопротеин принадлежит к суперсемейству АВС-транспортёров (АТР-Binding Cassette). К АВС-семейству относят более сотни транспортных белков, обнаруженных у разных организмов – от *E.coli* до человека [11]. В это семей-

ство входят белки, транспортирующие весьма разные субстраты – от неорганических ионов до полисахаридов и белков. Такие разнообразные транспортёры объединяет общая доменная организация – наличие трансмембранных и АТР-связывающих доменов, которые также называют АВС-доменами (рис. 1) [11]. АВС-Домены прокариотических и эукариотических белков данного семейства имеют 30–40% гомологии (независимо от их субстратной специфичности) [11]. О высокой консервативности белков этого семейства свидетельствуют опыты с трансфекцией в клетки человека гена, кодирующего бактериальный транспортёр LmrA [12]. Белок LmrA определяет резистентность бактерии *Lactococcus lactis* к антибиотикам. В клетках легкого человека с введенным геном LmrA полипептид с молекулярной массой 66 кДа обнаруживался в клеточной мембране. Трансфицированные клетки приобрели устойчивость к препаратам круга Рgp-МЛУ: антрациклинам, винка-алкалоидам, бромистому этидию, родамину. Резистентность снималась теми же ингибиторами, которые блокируют активность Рgp [12]. Эти опыты показали, таким образом, что бактериальный транспортёр может выполнять в клетках человека роль, присущую Рgp.

Полагают, что сайты связывания разных препаратов на молекуле белка различаются. Мутационный анализ гена, кодирующего Рgp,



позволил получить доводы в пользу прямого взаимодействия Pgp с его субстратами. Очевидно, сайты связывания белка с его субстратами локализованы в трансмембранных доменах или непосредственно под мембраной [13]. До последнего времени загадочной оставалась химическая природа широкой субстратной специфичности Pgp и ряда других транспортеров семейства ABC. Их способность транспортировать соединения разной химической природы и механизма действия разительно отличается от строгой специфичности большинства известных лигандсвязывающих белков. А.А. Нейфах и соавторы с помощью кристаллографических исследований показали, что для связывания субстрата бактериальным белком BmrR необходимы расплетание  $\alpha$ -спирали белка (лигандсвязывающего домена) и проявление внутреннего кармана, с отрицательно заряженным глутамином которого с высокой афинностью связываются положительно заряженные лиганды [14]. Можно полагать, что функционирование Pgp осуществляется по тому же принципу. BmrR – регулятор транскрипции *Bacillus subtilis* – активирует транспортер Bmr в ответ на связывание с BmrR различных индукторов, включая некоторые субстраты Pgp [14].

Ген *MDR1*, кодирующий P-гликопротеин, генетические механизмы Pgp-МЛУ. Pgp человека кодируется геном *MDR1*, принадлежащим к семейству MDR, локализованным в хромосоме 7 (7q21.1). Семейство MDR включает два гена человека (*MDR1* и *MDR2*) и три гена грызунов (*mdr1*, 2, 3). С помощью метода трансфекции показано, что лишь один ген человека (*MDR1*) и два гена грызунов имеют отношение к МЛУ. Мутации в некоторых сайтах гена *MDR1* могут приводить к изменению профиля перекрестной устойчивости клеток, т.е. к изменениям в связывании определенных субстратов. Введение в клетки гена *MDR2* к лекарственной устойчивости не приводило [15]. Показано, что продукт гена *MDR2* (у мышей *mdr2*) присутствует в больших количествах на поверхности клеток, выстилающих желчные капилляры, функционирует как флипаза и транспортирует в желчь фосфатидилхолин [16].

К МЛУ может приводить как изменение экспрессии гена *MDR1*, так и увеличение дозы гена – амплификация участка генома, содержащего ген *MDR1* и еще пять или шесть сцепленных с ним генов [17]. Амплификация обнаруживается обычно в культивируемых клеточных линиях с высокими уровнями Pgp-МЛУ, а не в материале, получаемом от больных. К МЛУ могут приводить также стабилизация мРНК *MDR1*, регуляция на уровне синтеза и процессинга белка [13]. Выска-

зывались предположения и относительно возможности непосредственной регуляции активности Pgp его субстратами [13].

Ген *MDR1* имеет две промоторные области – нижний и верхний промоторы. В тканях и клеточных линиях находят по преимуществу экспрессию нижнего промотора, который и рассматривается как основной элемент, регулирующий активность этого гена [18]. Транскрипционная активность гена *MDR1* возрастает в ответ на самые разные воздействия, включающие влияние химиотерапевтических препаратов, в том числе и не являющихся субстратами Pgp [19]. Очевидно, однако, что индуцибельность гена *MDR1* зависит от контекста клетки: разные индукторы по-разному влияют на активность этого гена в разных клетках. Было показано также, что весьма различающиеся индукторы могут вызвать и Pgp-МЛУ. Так, облучение культивируемых клеток китайского хомячка (линия CHO) приводило к возникновению резистентности к винкристину, связанной, возможно, с трансляционными или посттрансляционными изменениями Pgp [20]. Химические канцерогенные вещества индуцируют активность гена *MDR1* в клетках крысиной печени, после частичной гепатэктомии в регенерирующей печени крыс возрастает активность *MDR1* [21]. Некоторые цитокины в некоторых типах культивируемых клеток могут оказывать влияние на Pgp-МЛУ. Было найдено, что тепловой шок, агенты, индуцирующие дифференцировку, влияют на активность *MDR1*/Pgp [13]. Важно заметить, однако, что многие из этих эффектов наблюдали лишь в клетках некоторых линий культивируемых клеток, они также в высокой степени зависят от видовой и тканевой принадлежности клеток. Очевидно, таким образом, что при определенных условиях (по-видимому, в зависимости от активации в клетках тех или иных путей сигнальной трансдукции) активность *MDR1*/Pgp повышается в ответ на разнообразные индукторы, т.е. эта система легко активируется в разных, не только стрессорных ситуациях.

Исследования генов и путей сигнальной трансдукции, вовлеченных в регуляцию активности Pgp, свидетельствуют о том, что этих путей (генов) много, или по крайней мере, несколько. Так, с использованием введения в клетки промоторной области гена *MDR1* в составе конструкции, содержащей ген-репортер, а также в условиях стабильной трансфекции некоторых других генов было показано, что на активность промотора *MDR1* или эндогенного гена клеток могут влиять гены *p53*, *ras*, *raf*, *RAR $\alpha$*  и *RAR $\beta$*  (гены рецепторов ретиноевой кислоты) [22–24]. На активность гена *MDR1* влияли также

гены трансфакторов *c-fos* и *c-jun*, респонсивные элементы для которых имеются в промоторной области гена *MDR1* [13, 25]. Судя по результатам опытов с применением ингибиторов некоторых протеинкиназ, в регуляции активности Pgp принимают участие протеинкиназа С, протеинкиназа А и, возможно, еще некоторые протеинкиназы [13, 26]. Данные относительно множественности элементов, регулирующих активность *MDR1/Pgp*, свидетельствуют о том, что эта защитная система жизненно важна для клетки, и поэтому ее регуляция неоднократно продублирована.

**Экспрессия Pgp в нормальных тканях и клетках.** Pgp экспрессирован в разных тканях организма по-разному – от очень низкого, неопределимого уровня (например, клетки эпидермиса, пневмоциты) до высокого (например, клетки коры надпочечника, слизистая кишечника) [27]. Степень экспрессии гена *MDR1* в этих тканях различается в десятки раз (табл. 4). Иммунохимические исследования выявили в экспрессирующих Pgp тканях выраженную и относительно однородную окраску. Это относится к коре надпочечников, эпителиальным клеткам, выстилающим полости (слизистая кишечника, клетки почечных канальцев, трофобласты плаценты), а также к клеткам эндотелия сосудов мозга и яичек. Разная степень экспрессии Pgp относится и к клеткам системы кроветворения. В нормальном костном мозге стволовые клетки и ранние предшественники, несущие антиген CD34, экспрессируют функционально активный Pgp [28]. Затем по мере созревания клеток миелоидного ряда постепенно снижается как экспрессия этого белка, так и его функциональная активность [29]. Ясно, что новообразования, происходящие

из Pgp-экспрессирующих клеток, будут обладать предсуществующей МЛУ, а произошедшие из неэкспрессирующих Pgp клеток, изначально МЛУ обладать не должны. Ясно также, что нормальные лимфоциты могут иногда определять картину активности Pgp при исследовании периферической крови больного.

Тканевая специфичность экспрессии Pgp возбуждает вопрос о его физиологической роли в организме. Опыты с мышами, «нокаутированными» по гену *MDR1*, показывают, что основной функцией этого белка в организме является его защита от токсических воздействий [30]. Очевидно, Pgp несет «барьерные» функции, защищая лежащие ниже клетки от вредных веществ, содержащихся, например, в полости кишечника. Считают, что он поддерживает необходимый уровень стероидных гормонов в надпочечниках. Характер экспрессии Pgp и белка MRP в эпителии хорондного сплетения мозга свидетельствует об их роли в гематоэнцефалическом барьере [31]. По-видимому, высокая индуцибельность *MDR1/Pgp* связана с физиологическими функциями Pgp в организме.

**Роль МЛУ, опосредованной Pgp (Pgp-МЛУ), при злокачественных новообразованиях.** При некоторых новообразованиях экспрессию активного Pgp (или гиперэкспрессию кодирующего его гена *MDR1*) нередко обнаруживают в момент постановки диагноза: это чаще всего связано с тем типом клеток, из которых происходят данные новообразования. Таким образом, здесь нередко речь идет о МЛУ, связанной с тканевой принадлежностью опухолевых клеток. Высокие уровни экспрессии гена *MDR1* обнаруживают в нелеченных карциномах толстой кишки, почек, гепатомах, раках надпочечников, феохромоцитомах и др. [32]. При некоторых гемобластозах – остром миелолейкозе, хроническом лимфолейкозе, Т-клеточных лимфомах взрослых – также обычно МЛУ определяется тем типом клеток, из которых возникло новообразование [32]. Типирование клеток от больных с некоторыми гемобластозами, например, клеток больных в бластном кризе хронического миелолейкоза (ХМЛ), показывает, что часть случаев МЛУ новообразований, происходящих не обязательно из клеток, в норме экспрессирующих Pgp, также может быть связана с тем, что клетки определенного типа дифференцировки исходно экспрессируют этот белок [33]. Таким образом, в ряде случаев Pgp можно рассматривать как маркер определенного типа клеточной дифференцировки.

В качестве доводов в пользу роли приобретенной МЛУ в терапии приводят обычно данные, показывающие, что число случаев с гиперэкспрессией Pgp возрастает после проведения

Таблица 4. Экспрессия гена *MDR1* в различных тканях человека (по работе [27])

| Ткань             | Степень экспрессии гена <i>MDR1</i> |
|-------------------|-------------------------------------|
| Кожа, мышцы       | 1                                   |
| Толстая кишка     | 20                                  |
| Легкое            | 20                                  |
| Печень            | 25                                  |
| Ободочная кишка   | 31                                  |
| Почка             | 51                                  |
| Кора надпочечника | 160                                 |

курсов лечения, а также ссылаются на корреляцию экспрессии *MDR1/Pgp* и неэффективности терапии. Результаты, свидетельствующие в пользу значимости *Pgp*-МЛУ в исходе лечения, получены с помощью подобных исследований для аденокарцином легкого и яичников, рака молочной железы, сарком (включая остеосаркомы) [32]. При гемобластозах роль *Pgp*-МЛУ наиболее исследована: при остром миелолейкозе *Pgp*-положительными считают (по данным разных исследований) от 30 до 50% случаев и *Pgp* чаще обнаруживают после проведения курсов химиотерапии у больных, не поддающихся лечению [34]. Множественную миелому принято рассматривать как яркий пример заболевания, при котором *Pgp*-МЛУ возникает в результате лечения. В то время как при постановке диагноза не более 6% больных *Pgp*-положительны, после терапии, особенно по схеме VAD (винкристин, доксорубин, дексаметазон), до 85% резистентных к лечению пациентов оказываются *Pgp*-положительными [34].

При остром миелолейкозе повышенная экспрессия гена *MDR1* часто коррелирует с фенотипом незрелых клеток – экспрессией антигена CD34 [34]. При миелодиспластическом синдроме также найдена корреляция экспрессии *Pgp* и CD34. Это свидетельствует в пользу того, что в большей части случаев острого миелолейкоза и миелодиспластического синдрома *Pgp*-МЛУ связана с размножением ранних предшественников кроветворения. Очевидно, еще при одном миелопролиферативном нарушении ситуация та же: в бластном кризе хронического миелолейкоза мы обнаружили четкую корреляцию экспрессии функционально активного *Pgp* с экспрессией антигенов, характерных для предшественников и клеток ранней миелоидной дифференцировки – CD34 и CD13 [33]. Обнаружение *Pgp* при остром миелолейкозе, особенно в сочетании с CD34, считают плохим прогностическим признаком; неясно, однако, во всех ли случаях прогрессирование заболевания следует относить за счет активности *Pgp*. Для того чтобы настаивать на этом, необходимы повторные исследования больных по мере эволюции заболевания. Таких данных немного. Наши результаты изучения хронического миелолейкоза показывают, что часто у больных клетки, экспрессирующие *Pgp*, не только не накапливаются при терапии лекарствами – субстратами этого белка, но и исчезают [33]. Таким образом в этих случаях экспрессия активного *Pgp*, по-видимому, не способствует выживанию клеток в условиях терапии. Между тем мы нашли, что экспрессия *Pgp*-бластами периферической крови больного при постановке диагноза бластного криза хронического миело-

лейкоза прогнозирует более быстрое течение бластного криза [33]. Эти данные свидетельствуют о том, что связи экспрессии белков МЛУ с исходом терапии злокачественных новообразований не так просты, как кажется на первый взгляд. Мы объясняем наши результаты сочетанием разных механизмов МЛУ в одних и тех же клетках, где экспрессия *Pgp* является маркером активации в клетках сразу нескольких механизмов защиты от цитостатиков.

Таким образом, несмотря на необходимую осторожность в оценке результатов различных исследований, можно заключить, что в части случаев злокачественных новообразований *Pgp* играет роль в ответе больных на терапию и иногда может служить плохим прогностическим признаком, хотя даже и в этих случаях *Pgp* не всегда определяет сам по себе резистентность больных к лечению.

**Преодоление *Pgp*-МЛУ.** В связи с клинической значимостью *Pgp* работы по поискам путей ингибирования его активности привлекли внимание многих исследователей и фармацевтических компаний. Было найдено немало разнообразных соединений, преодолевающих в эксперименте *Pgp*-МЛУ: блокаторы кальциевых каналов (верапамил, нифедипин и др.), гипотензивные средства (резерпин), антибиотики (цефалоспорины, грамицидин, пуромицин), иммуносупрессоры (в первую очередь циклоспорин и его производные) и многие другие гидрофобные препараты [35]. Их объединяют лишь низкая молекулярная масса, гидрофобность и наличие ароматического кольца в молекуле. Для некоторых из них (например, для верапамила) показаны связывание с молекулой *Pgp* и конкуренция за связывание с лекарствами – субстратами *Pgp*. Естественно, все эти многочисленные блокаторы *Pgp* найдены в опытах *in vitro* с использованием культур клеток, отобранных на *Pgp*-МЛУ. Опыты с культурами показывают, что проблема преодоления *Pgp*-МЛУ сложна: например, влияние верапамила на клетки с 200-кратной устойчивостью к винбластину приводило к снижению резистентности примерно вдвое, однако перекрестная устойчивость к доксорубину почти не изменялась [36]. Клинические испытания показали, что для большинства модификаторов *Pgp*-МЛУ не удается получить в крови больных концентрации, необходимые для преодоления лекарственной устойчивости, так как повышение дозы дает тяжелые осложнения [35]. Разрабатываются менее токсичные и более эффективные модуляторы *Pgp*, к ним принадлежат производное циклоспорина PSC-833 и производное верапамила R-верапамил. С этими препаратами также не получено положительных результатов

в клинике, по-видимому, потому, что чаще всего МЛУ определяется не только одним Pgp, но и другими белками (см. ниже). В последние годы в качестве модификаторов Pgp-МЛУ начали применять моноклональные антитела к Pgp, однако пока они находятся в стадии проверки.

**1.2. Множественная лекарственная устойчивость, определяемая белком MRP.** По сравнению с Pgp белок MRP (белок, ассоциированный с МЛУ, или multidrug resistance associated protein) был открыт сравнительно недавно, в 1992 г., поэтому сведений относительно его роли в эволюции злокачественных новообразований гораздо меньше. Этот белок с молекулярной массой ~190 кДа обеспечивает резистентность опухолевых клеток примерно к тому же кругу противораковых препаратов, что и Pgp, и также является энергозависимым (требующим АТФ) насосом, выкачивающим из клетки токсические соединения, также принадлежащим к семейству ABC-транспортеров [37]. Роль MRP в лекарственной устойчивости доказана с помощью опытов с введением в клетки гена MRP [38]. Функция транспортера MRP отличается от активности Pgp: обнаружено, что для функционирования MRP необходим глутатион клетки. Это показывает, что этот белок является одним из транспортеров конъюгатов глутатиона (насосы, обозначаемые GS-X) [39, 40]. Сейчас известно уже несколько генов и белков, принадлежащих к семейству MRP, обнаруженных у весьма разных организмов – от человека до бактерий [40]. Среди них можно выделить белок cMOAT (MRP2), также насос GS-X, специфически локализованный на апикальной поверхности гепатоцитов, обращенной в желчные капилляры [40]. У крыс с дефектом по этому гену нарушена секреция в желчь глюкоронидов билирубина [40]. Играет ли cMOAT роль в МЛУ, пока неясно. Однако показано, что он может транспортировать винбластин, классический субстрат как Pgp, так и MRP.

Белок MRP определяет устойчивость клеток практически к тем же веществам, что и Pgp, однако с несколько другим спектром кросс-резистентности. Клетки, экспрессирующие MRP, обычно проявляют гораздо меньшую кросс-резистентность к таксолу, чем клетки с Pgp-МЛУ [39]. Полагают, что в нормальных – не резистентных и не опухолевых клетках белки MRP также транспортируют конъюгаты глутатиона, которые играют роль как в нормальной жизнедеятельности клетки, так и в воспалительных процессах. Повышенные количества MRP найдены в эпителии бронхов, его гиперэкспрессию связывают с бронхиальной астмой [37].

Невысокие базальные уровни экспрессии MRP были обнаружены во всех клетках перифе-

рической крови, независимо от их дифференцировки [37]. В большинстве случаев острого миелолейкоза, исследованных при постановке диагноза, бласты периферической крови сохраняют тот же базальный уровень экспрессии белка [41]. Появляются сведения о том, что в случаях острого миелолейкоза, резистентных к лечению, экспрессия MRP выше, чем в тех случаях, где достигнута полная ремиссия. Более высокое число случаев, в которых клетки экспрессировали повышенные количества MRP, обнаружено при хроническом лимфолейкозе. Работ, посвященных определению функциональной активности MRP, пока немного, однако, необходимый тест выработан. Можно надеяться, что применение функционального теста наряду с методами выявления белка на клетках даст более развернутые результаты.

Несмотря на то, что клиническая значимость MRP еще не совсем ясна, проводятся интенсивные поиски ингибиторов активности этого белка МЛУ. Пока ясно, что эффективные ингибиторы для MRP и Pgp разные, хотя ингибиторы активности Pgp в некоторой степени могут подавлять и функциональную активность MRP. Было найдено, что генистеин подавляет накопление даунорубина в клетках, гиперэкспрессирующих MRP, но не в клетках с гиперэкспрессией Pgp. Генистеин высокотоксичен и не может применяться для лечения больных, однако он используется в тестах на функциональную активность MRP. Применяются также ингибиторы синтеза глутатиона и ингибиторы протеинкиназы C [42].

**1.3. Множественная лекарственная устойчивость, определяемая белком LRP.** В отличие от белков Pgp и MRP, открытый в 1993 г. белок МЛУ LRP (lung-resistance-related-protein; молекулярная масса 110 кДа) с помощью антител обнаруживается не на клеточной мембране, а в цитоплазме. Его экспрессируют клетки нормального эпителия и клетки тканей, которые подвергаются токсическим воздействиям. Он является мажорным белком специфических клеточных органелл, рибонуклеопротеиновых частиц «vaults» [43]. Функция этих органелл в настоящее время неясна, однако полагают, что они могут участвовать в транспорте субстратов из ядра в цитоплазму. В клетке белок LRP нередко ассоциирован с везикулами и лизосомами, что позволяет связывать его функцию с транспортом лекарств и их секвестрацией внутри везикул. Полагают, что в дальнейшем препарат может выводиться из клетки путем экзоцитоза [44]. Имеются данные, свидетельствующие, что экспрессия LRP может быть причиной МЛУ при раке яичника и остром миелолейкозе [45, 46].





Введение генов различных изоформ GST в клетки млекопитающих сообщало им невысокие уровни МЛЮ [47]. Хотя клиническая значимость дву-, трехкратной устойчивости к алкилирующим соединениям неясна, эти данные нельзя не учитывать, имея в виду возможность одновременной активации в клетках нескольких разных генов защиты, что могло бы обеспечить начальные этапы селекции клеток с МЛЮ. Трансфекция генов GST человека в клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* сообщила им достаточно высокую степень устойчивости к адриамицину и хлорамбуцилу [49]. Эти опыты, так же как и в случае Pgp, свидетельствуют о высокой консервативности данной системы защиты клеток.

Ингибиторы активности глутатион-S-трансфераз рассматриваются как наиболее перспективные модификаторы данного типа лекарственной устойчивости. В связи с этим этакриновая кислота (обычно применявшаяся как диуретик) проходит клинические испытания в качестве препарата, преодолевающего лекарственную устойчивость, связанную с GSH [50]. BSO (бутионинсульфоксамин) снижает внутриклеточный уровень глутатиона и преодолевает устойчивость клеток к алкилирующим соединениям [47]. BSO применяют в экспериментах в качестве препарата, влияющего на МЛЮ, определяемую MRP [38]. С GSH связывают результаты лечения лимфом. Повышение активности GST наблюдается в устойчивых к хлорбутину случаях хронического лимфолейкоза [51]. Экспрессию этих ферментов рассматривали, как прогностический признак при ранних формах рака молочной железы [52, 53]. Нужно заметить, однако, что, так же как в случаях с Pgp, нет оснований говорить о том, что резистентность, связанная с изменениями системы GSH, может полностью объяснить устойчивость больных какими-либо злокачественными новообразованиями к терапии. Более того, в пользу клинической значимости данного типа МЛЮ, несмотря на интенсивные исследования, получено гораздо меньше доводов, чем в пользу роли Pgp-МЛЮ для результатов терапии некоторых злокачественных новообразований.

### 3. ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ, СВЯЗАННАЯ С ИЗМЕНЕНИЕМ МИШЕНЕЙ ПРЕПАРАТОВ ИЛИ С ИХ ПОВЫШЕННОЙ РЕПАРАЦИЕЙ

Ряд препаратов, применяемых при лечении злокачественных новообразований являются ингибиторами топоизомераз (топоизомеразы I, чаще – топоизомеразы II). В их круг входят препараты, стабилизирующие комплекс топоизо-

мераза–ДНК, который в нормальных условиях быстро распадается. В культивируемых клетках, резистентных за счет изменений топоизомеразы II, обнаруживают либо снижение активности этого фермента, либо снижение его количества [54]. Найдены мутации гена топоизомеразы II, с которыми связывают лекарственную устойчивость [54]. К препаратам, к которым возникает этот тип резистентности, принадлежат адриамицин, рубомицин, митоксантрон, этопозид и др. Таким образом, большинство веществ, взаимодействующих с молекулой топоизомеразы II, являются также субстратами Pgp или MRP. Клиническая значимость этого типа МЛЮ пока неясна. Существуют экспериментальные данные, показывающие, что применение лекарства в комбинации с модификаторами активности Pgp может привести к возникновению МЛЮ, определяемой топоизомеразой II. Очевидно, и этот тип МЛЮ сосуществует иногда с другими механизмами лекарственной устойчивости в одних и тех же клетках.

Еще одним возможным путем изменения мишени препарата является увеличение количества белка-мишени в клетке. Например, в целом ряде культивируемых клеточных линий, резистентных к метотрексату, обнаруживалось увеличение количества белка-мишени этого препарата – дигидрофолатредуктазы (ДГФР), связанное с амплификацией гена ДГФР. Однако данный тип устойчивости не является множественной лекарственной устойчивостью.

Повышенная эффективность репарации поврежденного ДНК, по-видимому, играет роль в резистентности к таким препаратам, как препараты нитрозометилмочевины или платины, механизм действия которых – это взаимодействие с молекулой ДНК. Так, устойчивость к BCNU (кармустину) коррелирует с экспрессией O-6-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы. Изменение количества белков, распознающих и репарирующих повреждения ДНК (ERCC1, ERCC2 и ERCC3/XPB), было найдено при изменениях чувствительности культивируемых клеток к препаратам платины [55]. Некоторые из таких линий устойчивы к нескольким препаратам, однако круг перекрестной устойчивости гораздо уже, чем при Pgp-МЛЮ.

### 4. РОЛЬ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ АПОПТОЗ, В ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

4.1. p53 и множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток. Важнейшим элементом ответа клетки на стрессорные воз-

действия, в том числе на воздействие химиотерапевтических препаратов, является ген p53 и регулируемые им гены (подробнее см. обзоры Б.П. Копнина и П.М. Чумакова в этом номере журнала). Нормальный p53 активируется в ответ на различные повреждающие клетку воздействия, что приводит к остановке пролиферации клеток или к апоптозу. Таким образом, поврежденные клетки либо удаляются из популяции, либо у клеток появляется возможность репарировать поврежденную ДНК. Изменения p53, весьма частые в опухолях, обуславливают нарушения его нормальной функции и нарушение способности клеток вступать в апоптоз или останавливаться в некоторых точках клеточного цикла в ответ на повреждение. Таким образом, нарушения функции p53 *a priori* могут привести к изменениям чувствительности опухолевых клеток к воздействию химиотерапевтических препаратов, в частности к множественной лекарственной устойчивости.

В число индукторов, активирующих нормальный p53, входят агенты, разными способами повреждающие ДНК, изменения пула рибонуклеотидов в клетке, изменения редокс-потенциала (например, накопление атомов активного кислорода в клетке), разрушение веретена деления и др. [56]. Поскольку механизмы действия ряда противоопухолевых препаратов связаны с этими воздействиями на клетку, очевидно, что многие из цитостатиков должны являться активаторами p53. Действительно, большое исследование Национального ракового института США, включившее 60 линий культивируемых опухолевых клеток и более 100 противоопухолевых препаратов, выявило прямую корреляцию между статусом p53 в клетках и их чувствительностью к цитотоксическому действию лекарств [57]. Клетки с мутантным p53 чаще всего были более резистентными к препаратам с разным механизмом действия (например, к цисплатину и 5-фторурацилу), чем клетки, обладавшие p53 дикого типа. Эти данные свидетельствуют о существенной роли p53 в определении чувствительности злокачественных новообразований к химиотерапии.

Очевидно, однако, что и эта проблема не так проста. Исследования регуляции p53 показывают, что характер модификаций, активирующих этот белок в ответ на стимулы, зависит от стрессорного воздействия, от тканевой и видовой принадлежности клеток, от типа аминокислотной замены в мутантном p53 [56]. Разные повреждающие воздействия не только разными способами активируют p53, но и эта активация осуществляется через разные сигнальные пути [56]. Эти, а, возможно, и другие особенности регуляции p53 определяют существенные разли-

чия ответа разных опухолевых клеток на одни и те же воздействия и различия в результатах влияния на p53 одних и тех же клеток разных повреждающих агентов. Приведем примеры таких разных эффектов: активация p53 в ответ на повреждение ДНК приводила к гибели (апоптозу) фибробластов человека, в то время как размножение фибробластов грызунов лишь временно задерживалось [58]. В одной из работ было обнаружено, что гиперэкспрессия p53 в культивируемых клетках легкого человека линии H1299 потенцирует, как и следовало ожидать, цитотоксический эффект цисплатина, однако защищает эти клетки от токсического действия випезида [59]. Известно, однако, что в других клетках (в тимоцитах мыши) p53 определяет индукцию апоптоза именно випезидом [58]. Антиапоптотический (вместо ожидаемого апоптотического) эффект p53 отмечен и в нескольких других работах.

Таким образом, p53, несомненно, играет важную роль в определении чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам, однако характер влияния p53 на лекарственную устойчивость опухолевых клеток может существенно меняться в зависимости от механизма действия лекарственного препарата, видовой, тканевой принадлежности клеток, а также, очевидно, от тех генетических изменений, которые возникли в опухолевой клетке в ходе канцерогенеза и опухолевой прогрессии, в том числе и от различий в изменениях самого гена p53 в клетках.

Белки, синтез которых контролирует транскрипционный фактор p53 (p21<sup>Waf-1</sup>, MDM), также могут влиять на чувствительность клеток к цитостатикам. Факты, полученные в пользу их значения для лекарственной устойчивости опухолевых клеток, сходны с полученными для p53. Иногда в экспериментах эффекты p53 и контролируемых им белков на чувствительность клеток к лекарствам могут не совпадать.

**4.2. Антионкоген PTEN и лекарственная устойчивость опухолевых клеток.** Еще одной системой, имеющей отношение к лекарственной устойчивости опухолевых клеток, является система передачи сигнала, вовлекающая ген *PTEN*. *PTEN* – опухолевый супрессор, имеющий гомологию с тирозинфосфатазами и тензином, белком, ассоциированным с актиновым цитоскелетом в фокальных контактах клетки (см. обзор Б.П. Копнина в данном номере). Белок *PTEN* обладает способностью дефосфорилировать субстраты как по тирозину, так и по треонину. *PTEN*, очевидно, выполняет роль опухолевого супрессора, являясь негативным регулятором фосфатидил-инозитол-3'-киназного (PI3'K) PKB/Akt сигнального пути [60]. Известно, что протеинки-

наза B/Akt является важнейшим регулятором выживания клетки. Таким образом, поскольку *PTEN* негативно влияет на выживаемость клеток в неблагоприятных условиях, его активация может повысить чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии, а его инактивация определит лекарственную резистентность.

Действительно, показано, что клетки, дефектные по *PTEN*, обладают определенной степенью резистентности к целому ряду повреждающих (индуцирующих апоптоз) воздействий: ультрафиолетовым лучам,  $TNF\alpha$ , циклогексимиду, анизомицину, сорбитолу, тепловому шоку [60]. В таких устойчивых клетках были конститутивно повышены активность и фосфорилирование протеинкиназы B/Akt.

**4.3. Влияние онкогена *BCL-2* и других генов семейства *BCL-2* на лекарственную устойчивость опухолевых клеток.** *BCL-2* – онкоген, участвующий в процессе возникновения злокачественного новообразования в связи с тем, что он подавляет апоптоз (см. обзор Б.П. Копнина). Он принадлежит к большому семейству генов, продукты которых обладают как антиапоптотическим (например, *Bcl-2*, *Bcl-Xl*) так и проапоптотическим действием (Bax, Bad, Bic, др.) [61]. Кодированные этими генами полипептиды могут образовывать гомо- и гетеродимеры, сочетания членов которых определяют их влияние на апоптоз [61]. Белок *Bcl-2* способен тормозить апоптоз, вызываемый p53 в ответ на генотоксические воздействия [62]. Показано, что гиперэкспрессия *Bcl-2* сообщает клеткам лекарственную устойчивость к различным химиотерапевтическим препаратам [63]. Существуют данные, показывающие, что экспрессия гена *BCL-2* может рассматриваться как плохой прогностический признак при ряде новообразований – например, при раке мочевого пузыря, новообразованиях системы кроветворения лимфоидного и миелоидного ряда (цитировано по работе [64]).

**4.4. Система *CD95-L/CD95 (FasL/Fas)* и лекарственная устойчивость.** Система лиганд–рецептор *CD95-L/CD95 (FasL/Fas)* или *APO1* играет важную роль в апоптозе некоторых типов клеток. Лиганд *CD95-L* (лиганд, т.е. связывающее рецептор вещество) – интегральный белок мембраны, который может выходить во внеклеточную среду и действовать как растворимый цитокин (фактор роста) [65]. Существуют и другие, сходные с *CD95-L* цитокины – индукторы апоптоза – фактор некроза опухолей ( $TNF\alpha$ ), *TRAIL* и др. Связываясь со своим рецептором, *CD95-L* (или другой сходный цитокин) включает цепь передачи сигнала, приводящего к апоптозу.

Есть данные, показывающие, что система *CD95-L/CD95* может иметь отношение к гибели

опухолевых клеток под влиянием химиотерапевтических препаратов, а нарушения в функционировании этой системы могут приводить к лекарственной устойчивости [66]. Так, показано, что лимфоциты мышей, мутантных по гену рецептора *CD95*, а также линии клеток, резистентные к *CD95-L*, устойчивы к ряду химиотерапевтических препаратов [67–69]. Было обнаружено также, что воздействия, блокирующие данный сигнальный путь, препятствуют апоптозу, вызванному химиопрепаратами. Однако при использовании некоторых линий клеток были получены результаты, свидетельствующие, что система *CD95-L/CD95* не играет роли в апоптозе, вызываемом лекарственными препаратами [70, 71]. Таким образом, так же как и в случаях других механизмов, описанных выше, характер влияния данной системы на лекарственную чувствительность опухолевых клеток не всегда однозначен и, очевидно, зависит от целого ряда параметров.

Итак, изложенные выше результаты изучения механизмов множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток показывают, что эти механизмы множественны. Между тем мы отразили лишь основные из них. Так, например, не описано влияние изменений пролиферации опухолевых клеток на их чувствительность к лекарствам. Открытия новых генов и белков, обуславливающих защиту клетки от повреждений, продолжают. Множественность и разнообразие механизмов МЛУ значительно затрудняют как диагностику причин устойчивости больных к терапии, так и выработку разумных протоколов по преодолению МЛУ опухолевых клеток.

Обсуждение каждого отдельного механизма МЛУ показывает, что чувствительность опухолевых клеток к терапии в большой степени зависит от того, что сейчас принято называть «клеточным контекстом» – от сочетания особенностей регуляции жизненно важных процессов клетки, связанных с ее видовой, тканевой принадлежностью, а также с теми генетическими изменениями, которые произошли в клетке в ходе ее малигнизации и прогрессии новообразования. Этот феномен также осложняет диагностику причин МЛУ опухолей.

Очевидно, среди различных механизмов лекарственной устойчивости можно выделить те, которые чаще встречаются и для которых доказана их клиническая значимость. Важнейшее значение, несомненно, имеют изменения генов и белков, контролирующих апоптоз и выживаемость опухолевых клеток (в первую очередь, изменения p53 и *Bcl-2* (разделы 4.1 и 4.2), а также такие защитные механизмы, как повышение ак-

тивности белка-транспортера Pgp и функционирование системы глутатиона (разделы 1.1 и 2). Хотя исследования клинической значимости каждого из этих ключевых механизмов МЛУ, как следует из изложенного выше, свидетельствуют об их важной роли в результатах терапии некоторых новообразований, не так редки и отрицательные данные. Это определяет необходимость дальнейшего исследования роли различных механизмов в возникновении МЛУ опухолей. Очевидно, в зависимости от изменений в клетках данного новообразования генов, определяющих малигнизацию, и от характера экспрессии белков (например, Pgp), присущего в норме данной ткани, набор генов или белков, исследуемых с целью диагностики причин МЛУ должен быть разным для разных неоплазий.

При планировании набора методов, выявляющих МЛУ, нельзя забывать, что, хотя и существуют определенные механизмы лекарственной устойчивости, наиболее характерные для резистентности клеток к данному препарату, чаще всего устойчивость клеток к конкретному веществу может определяться несколькими причинами. Так, например, устойчивость к цисплатину может быть связана с активацией системы глутатиона, повышенным выбросом препарата из клетки, изменениями регуляции апоптоза, повышением эффективности репарации ДНК [55].

Существенно понимать также, что в одной и той же клетке (не говоря о гетерогенной популяции опухолевых клеток) могут сосуществовать разные механизмы МЛУ. Более того, разные механизмы МЛУ могут быть связаны между собой; эти связи исследованы мало, однако примеры таких связей можно привести. Так, например, было найдено, что если подавить в клетках

активность белка p53 дикого типа (это отменяло апоптоз, вызванный лекарствами), то активируется белок Pgp [72]. Таким образом, в данном случае имели место сосуществование и взаимосвязь двух типов МЛУ – обусловленной нарушением функции нормального белка p53 и обусловленной активностью Pgp. О связи белка-транспортера MRP и системы глутатиона мы писали выше (см. раздел 1.2).

Для повышения эффективности химиотерапии опухолей неоднократно предлагались различные методы определения индивидуальной чувствительности клеток данной опухоли к ряду химиопрепаратов. В настоящее время применяется набор методик с использованием краткосрочных культур клеток больного, позволяющих судить о чувствительности клеток пациента к различным препаратам. В круг этих методов входят тесты, оценивающие влияние препаратов на размножение клеток, оценка экспрессии отдельных белков или генов, определяющих МЛУ опухолевых клеток (в частности, Pgp, Bcl-2, ферментов системы глутатиона и др.), а также некоторые другие тесты [73]. При гемобластозах детей такие тесты, применяемые комплексно, уже дают сведения, позволяющие выбрать необходимую терапию.

С точки зрения изучения защитных систем клетки наиболее интересным представляется исследование сигнальных путей, участвующих в регуляции различных систем, а также связей между разными путями сигнальной трансдукции.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99-04-48617).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hannun, Y.A. (1997) *Blood*, 89, 1845–1853.
2. Комбинированное и комплексное лечение больных со злокачественными опухолями, (под ред. Чиссова В.И.), Медицина, Москва, 1989.
3. Biedler, J.L., and Reihm, H. (1970) *Cancer Res.*, 30, 1174–1179.
4. Jones, R.J. (1997) *Curr. Opin. Oncol.*, 9, 3–7.
5. Simon, S.M., and Schindler, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91, 3497–3504.
6. Bradley, G., Juranka, P.F., and Ling, V. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, 948, 87–128.
7. Higgins, C.F., Callaghan, R., Linton, K.J., Rosenberg, M.F., and Ford, R.C. (1997) *Sem. Cancer Biol.*, 8, 135–142.
8. Dano, K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 323, 466–483.
9. Neyfakh, A.A. (1988) *Exp. Cell Res.*, 174, 168–176.
10. Egudina, S.V., Stromskaya, T.P., Frolova, E.A., and Stavrovskaya, A.A. (1993) *FEBS Lett.*, 329, 63–66.
11. Higgins, C.F. (1995) *Cell*, 82, 693–696.
12. Van Veen, H.W., Callaghan, R., Soceneuntu, L., Sardini, A., Konings, W.N., and Higgins, C.F. (1998) *Nature*, 391, 291–295.
13. Bosh, I., and Croop, J. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1288, F37–F54.
14. Zheleznova, E.E., Markham, P.N., Neyfakh, A.A., and Brennen, R.G. (1999) *Cell*, 96, 353–362.
15. Gros, P., and Buschman, E. (1993) *Int. Rev. Cytol.*, 137C, 169–197.
16. Smit, J.J.M., Schinkel, A.H., Oude Ellering, R.P.J., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemeter, L., Mol, C.A.A.M., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M.T., van Roon, M.A., van der Valk, M.A., Offerhaus, G.J.A., Berns, A.J.M., and Borst, P. (1993) *Cell*, 75, 451–462.
17. Borst, P. (1991) *Acta Oncol.*, 30, 87–101.
18. Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M.M. (1987) *J. Biol. Chem.*, 268, 17432–17436.
19. Chaudhary, P.M., and Roninson, I.B. (1993) *J. Natl. Cancer Inst.*, 85, 632–639.

20. Hill, B.T., Deucharts, K., Hosking, L.K., Ling, V., and Whelan, R.D.H. (1990) *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 607-611.
21. Burt, R.K., and Thorgeirsson, S.S. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 1383-1386.
22. Teeter, L.D., Ecksberg, T., Tsai, Y., and Kuo, K.T. (1991) *Cell Growth Differ.*, **2**, 429-437.
23. Chin, K.-V., Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M.M. (1992) *Science*, **255**, 459-462.
24. Stromskaya, T.P., Rybalkyna, E.Yu., Shtil, A.A., Zabolina, T.N., Filippova, N.A., and Stavrovskaya, A.A. (1998) *Brit. J. Cancer*, **77**, 1718-1725.
25. Bhushan, A., Abramson, R., Chiu, J.F., and Tritton T.R. (1992) *Mol. Pharmacol.*, **42**, 69-74.
26. Chaudhary, P.M., and Roninson, I.B. (1992) *Oncol. Res.*, **4**, 281-290.
27. *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells* (Roninson, I.B., ed.), 1990, Plenum Press, N.Y.-London.
28. Chaudhary, P.M., and Roninson, I.B. (1991) *Cell*, **66**, 85-94.
29. List, A.F. (1996) *Leukemia*, **10**, 937-942.
30. Schimkel, A.H. (1997) *Sem. Cancer Biol.*, **8**, 161-170.
31. Vallabhaneni, V., Rao, J.L., Dahlheimer, M.E., Bardgett, A.Z., Snyder, R.A., Finch, A.C., and Sartorelli, D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3900-3905.
32. Goldstein, L.G. (1997) *Eur. J. Cancer*, **32A**, 1039-1050.
33. Stavrovskaya, A., Turkina, A., Sedyakhina, N., Stromskaya, T., Zabolina, T., Khoroshko, N., and Baryshnikov, A. (1997) *Leukemia and Lymphoma*, **28**, 469-482.
34. Marie, J.-P., Zhou, D.-C., Gurbuxani, S., Legrand, O., and Zittoun, R. (1996) *Eur. J. Cancer*, **32A**, 1034-1038.
35. Sandor, V., Fojo, T., and Bates, S.E. (1998) *Drug Res. Updates*, **1**, 190-200.
36. Beck, W.T., Cirtain, M.C., Look, A.T., and Ashmun, R.A. (1986) *Cancer Res.*, **46**, 778-784.
37. Loe D.W., Deeley, R.G., and Cole, S.P.C. (1996) *Eur. J. Cancer*, **32A**, 945-957.
38. Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Cole, S.P.C., and Deeley, R.G. (1994) *Cancer Res.*, **54**, 357-361.
39. Deeley, R., and Cole, S.P.C. (1997) *Sem. Cancer Biol.*, **8**, 193-204.
40. Borst, P., Kool, M., and Evers, R. (1997) *Sem. Cancer Biol.*, **8**, 205-213.
41. Broxterman, H.J., and Schuurhuis, G.J. (1997) *J. Intern. Medicine*, **242**, suppl. 740, 147-151.
42. Sarkadi, B., and Muller, M. (1997) *Sem. Cancer Biol.*, **8**, 171-182.
43. Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L.G., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M., Meijer, C.J.L.M., Clevers, Y.C., and Scheper, R.J. (1995) *Nature Med.*, **1**, 578-582.
44. Isquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Schrorijers, A.B., van der Valk, P., and Scheper, R.J. (1996) *Eur. J. Cancer*, **32A**, 979-984.
45. Isquierdo, M.A., van der Zee A.G.J., Vermorken, J.B., van der Valk, P., Belien, J.A.M., Giaccone, G., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Pinedo, H.M., Kenemans, P., Meijer, C.J.L.M., de Vrie, E.G.E., and Scheper, R.J. (1995) *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**, 1230-1237.
46. List A.F., Spier, C.G., Grogan, T.M., Johnson, C., Roe, D.J., Greer, J.P., Wolff, S.N., Broxterman, H.J., Scheper, R.J., Scheffer, G.L., and Dalton, W.S. (1996) *Blood*, **87**, 2464-2469.
47. Tew, K.D. (1994) *Cancer Res.*, **54**, 4313-4320.
48. Sinha, B.K., Mimnaugh, E.G., Rajagopalan, S., and Myers, C.E. (1989) *Cancer Res.*, **49**, 3844-3848.
49. Black, S.M., Beggs, G.D., Hayes, J.D., Bartozek, A., Muramatsu, M., Sakai, M., and Wolf, C.R. (1990) *Biochem. J.*, **268**, 309-315.
50. Shen, H., Kauvar, L., and Tew, K.D. (1997) *Oncology Res.*, **9**, 295-302.
51. Schisselbauer, J., Silber, R., Papadopoulos, E., La Creta, F.P., and Tew, K.D. (1990) *Cancer Res.*, **50**, 3569-3573.
52. Gilbert, L., Etwood, L., Merino, M., Masood, S., Barnes, R., Steinberg, S., Lazarus, D., Pierce, L., D'Angelo, T., Moscowa, J.A., Townsend, A.J., and Cowan, K.H. (1993) *J. Clin. Oncol.*, **11**, 49-58.
53. Toffoli, G., Frustaci, S., Tumiotto, L., Gherlizoni, F., Picci, P., and Boicci, G. (1992) *Ann. Oncol.*, **3**, 63-69.
54. Pommier, Y., Leteurtre, F., Fesen, M.R., Fujimori, A., Bertrand, R., Solary, E., Kohlhaagen, G., and Köhn, K.W. (1994) *Cancer Invest.*, **12**, 530-542.
55. Chu, G. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 787-790.
56. Glaccia, A.J., and Kastan, M.B. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 2973-2983.
57. O'Connor, P.M., Jackman, J., Bai, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J., Friend, S., Fornace, A.J., and Kohn, K.W. (1997) *Cancer Res.*, **57**, 4285-4300.
58. Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., and Wyllie, A.H. (1993) *Nature*, **362**, 849-852.
59. Wang, Y., Blandino, G., Oren, M., and Givol, D.O. (1998) *Oncogene*, **17**, 1923-1930.
60. Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1998) *Cell*, **95**, 29-39.
61. Adams, J.M., and Cory, S. (1998) *Science*, **281**, 1322-1326.
62. Chiou, S.K., Rao, L., and White, E. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2556-2563.
63. Dive, C. (1997) *J. Intern. Med.*, **242**, suppl. 740, 139-145.
64. Allouche, M., Bettaieb, A., Vindis, C., Rousse, A., Grignon, C., and Laurent, G. (1997) *Oncogene*, **14**, 1837-1835.
65. Nagata, S. (1997) *Cell*, **88**, 355-365.
66. Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P., and Debatin, K.-M. (1999) *Int. J. Cancer*, **80**, 417-424.
67. Reap, E.A., Roof, K., Maynor, K., Borrero, M., Booker, J., and Cohen, P.L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5750-5755.
68. Friezen, C., Herr, I., Krammer, P.H., and Debatin, K.-M. (1996) *Nature Med.*, **2**, 574-577.
69. Landowski, T.H., Gleason-Guzman, M.C., and Dalton, W.S. (1997) *Blood*, **89**, 1854-1861.
70. Eichen, C.M., Kottke, T.J., Martins, L.M., Basi, G.S., Tung, J.S., Earnshaw, W.S., Leibson, P.J., and Kaufmann, S.H. (1997) *Blood*, **3**, 935-943.
71. Vilunger, A., Egle, A., Kos, M., Hartmann, B.L., Gleley, A., Kofler, R., and Greil, R. (1997) *Cancer Res.*, **57**, 3331-3334.
72. Thottassery, J.V., Zambetti, G.P., Arimori, K., Schuetz, E.G., and Schuetz, J.D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11037-11042.
73. Fruebauf, J.P., and Bosanquet, A.G. (1993) *Principles Practice Oncol.*, **7**, 1-16.



## CELLULAR MECHANISMS OF MULTIDRUG RESISTANCE OF TUMOR CELLS

A.A. Stavrovskaya

*Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,  
Russian Academy of Medical Sciences,  
Kashirskoye sh. 24, Moscow, 115478; fax: (095) 324-1205,  
E-mail: Alla@Astavrovskaya.home.bio.msu.ru*

Submitted September 17, 1999

Multidrug resistance (MDR) is resistance of tumor cell population to many drugs differing in chemical structure and in the mechanisms of action on the cell. MDR is regarded as one of the major causes of the failures of the human malignancies therapy. The recent studies show that molecular mechanisms of MDR are numerous. Cellular drug resistance is mediated by the different mechanisms dealing with various steps of cytotoxic action of the drug: from decrease of intercellular quantity of the drug to the abrogation of apoptosis induced by the chemical substance. Often several different mechanisms are switched on in the cell, however usually one major mechanism is operating. The most investigated mechanisms with known clinical significance in some types of malignancies are: activation of transmembrane proteins effluxing different chemical substances from the cells (P-glycoprotein is the most known efflux pump); activation of the enzymes of glutathione detoxification system; alterations of the genes and proteins involved into the control of apoptosis (at the first place p53 and Bcl-2).

**KEY WORDS:** multidrug resistance, mechanisms of cell defense, P-glycoprotein, glutathione S-transferases, apoptosis, p53, Bcl-2.

## МЕХАНИЗМЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ

### Обзор

© 2000 г. Г.И. Абелев

*Институт канцерогенеза Российского  
онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115478 Москва, Каширское ш., 24; факс: (095) 324-1205,  
электронная почта: abelev(@)mx.iki.rssi.ru*

Поступила в редакцию 17.09.99

Рассматривается проблема взаимоотношения механизмов дифференцировки с созданием и поддержанием опухолевого фенотипа. Показано, что карциномы в большей или меньшей степени сохраняют признаки дифференцировки исходной нормальной ткани, а гемобластозы очень точно отражают направление и уровень дифференцировки клетки-предшественницы. И в карциномах, и в гемобластозах сохраняется способность к индукции дифференцировки. Рассмотрены механизмы дифференцировки В- и Т-клеток, участвующие в активации протоонкогенов при транслокации их в район активного тканеспецифичного гена – Ig или TCR. Показано, что кроме классических онкогенов (т.е. PRAD, BCL-2) таким путем могут активироваться гены гетерологических дифференцировочных трансфакторов. Их активация не в свое время или не на своем месте является причиной опухолевой трансформации во многих лейкозах. Подробно рассмотрены «химерные» гены и «слитые» белки, возникающие вследствие специфических транслокаций, ведущих к опухолевой трансформации, и их участие в дифференцировке и поддержании опухолевого фенотипа. Приведены ситуации, где индукция терминальной дифференцировки в лейкозах ведет к существенному терапевтическому эффекту. Такими лейкозами являются волосато-клеточный лейкоз, промиелоцитарная лейкемия и отчасти хронический миелоидный лейкоз. Отдельно рассмотрена роль межклеточных взаимодействий в сдерживании роста карцином и поддержании дифференцировочного статуса клеток. Высказано предположение, что разрушение этих взаимодействий в прогрессии карцином одновременно ведет к стимуляции опухолевого роста и снижению уровня их дифференцировки, что является причиной резэкспрессии в опухолях эмбриональных антигенов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** дифференцировка в опухолях, транслокации в гемобластозах, прогрессия опухолей, внеклеточный матрикс, альфа-фетопротеин, резэкспрессия в гепатомах.

### ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КАРЦИНОМ

Нарушение гистотипа с более или менее выраженной утратой тканевой специфичности является характерным признаком эпителиальных опухолей (карцином). Это легло в основу представлений, что у опухолей больше сходства между собой, чем с нормальными тканями, из которых они возникли [1], а также концепции антигенного упрощения опухолей [2]. Однако эти представления имеют множество исключений, существенно меняющих всю картину. Так, при детальном анализе антигенной структуры экспериментальных опухолей печени (гепатом) нами было показано, что эти опухоли никогда не теряют полностью тканеспецифических антигенов и всегда сохраняют признаки исходной ткани [3]. При этом набор тканеспецифических антигенов едва ли не полностью может сохраняться в высокодифференцированных гепатомах или частично быть представлен в умеренно-дифференцированных либо почти полностью

может утрачиваться в низкодифференцированных (анapластических) опухолях. В низко- и умеренно-дифференцированных гепатомах возобновляется синтез эмбриоспецифического белка – альфа-фетопротеина (АФП), который также является тканеспецифическим продуктом эмбриональной печени [4]. АФП стал первым иммунологическим маркером карцином, положившим начало целому семейству белков, появление которых в крови является диагностическим признаком определенной опухоли или группы родственных опухолей [5].

Детальное исследование опухолевых маркеров показало, что все они являются дифференцировочными антигенами, т.е. тканеспецифическими белками или гликопротеинами, сохраняющимися в соответствующих опухолях и служащими как бы индикаторами их появления и развития [5]. Сохранение направления и уровня дифференцировки клетки-предшественницы особенно четко проявляется в опухолях кроветворной системы – лейкозах и лимфомах. В этих опу-

хотя глубинные связи между дифференцировкой и опухолевой трансформацией прослежены наиболее полно. Мы специально рассмотрим эти отношения в дальнейшем, а здесь остановимся на особенностях и роли дифференцировки в карциномах, т.е. опухолях эпителиальных тканей.

Прежде всего мы хотели бы остановиться на двух особенностях дифференцировки карцином: на снижении ее проявлений по мере развития опухоли и сохранении дифференцировочных потенциалов опухолевых клеток даже при внешней утрате признаков дифференцировки.

Широкий спектр уровня дифференцировки карцином и тенденция к его снижению определяются двумя факторами – дифференцировочным уровнем клетки-предшественницы и постоянно идущей эволюцией – прогрессией – опухоли.

Опухоли возникают не на любой стадии дифференцировки. Их предшественники, как правило, – стволовые и полустволовые клетки, находящиеся на узловых стадиях дифференцировки, детерминированные к нескольким или одному направлению развития и способные к ограниченному (или неограниченному) самоподдержанию [6]. Именно эти клетки находятся на кратчайшем расстоянии от стволовой клетки опухоли, так как переход от ограниченного самоподдержания к неограниченному (бессмертию) и от регулируемой пролиферации к автономной достаточен для опухолевой трансформации.

Трансформация, которая происходит на стадии коммитированного предшественника, останавливает дифференцировку на этой стадии – блокирует онтогенез данной клеточной линии [7] и тем самым как бы снижает уровень ее дифференцировки. На самом деле трансформация «замораживает» направление и уровень дифференцировки клетки-предшественницы. Далее вступает в свои права прогрессия опухоли – накопление мутаций и отбор клонов с максимальной скоростью пролиферации, максимально независимых от контролирующих факторов организма и максимально агрессивных – способных жить на территориях негомологичных тканей, т.е. способных к инвазии и метастазированию. Естественно, что утрата опухолью структур и функций, выполняемых нормальной тканью в «интересах» организма, будет происходить в соответствии с «целью» прогрессии. Правда, пути такого упрощения в эволюции опухоли строго индивидуальны [8]. Непонятно другое – почему подобное «упрощение» не доходит до конца, почему гепатомы начинают синтезировать совсем не нужный им АФП, плазмцитомы – Ig, не обладающий никакой биологической активнос-

тью, а мелкоклеточный рак легкого – нейротрофические пептиды? Почему нет или почти нет «безликих» опухолей? И почему всегда хотя бы разрозненные признаки дифференцировки исходной ткани сохраняются в опухоли [9]?

Дифференцировочный статус ткани проявляется в опухолях не только в сохранении тканеспецифических структур и функций, но еще более демонстративно – в сохранении дифференцировочных потенциалов, свойственных клеткам-предшественникам опухоли. Впервые это было четко показано на модели экспериментальных тератокарцином – опухолей, возникающих из предшественников герминальных клеток, обладающих дифференцировочными потенциалами ранних эмбриональных клеток [10, 11]. Эти опухоли могут перевиваться *in vivo* или поддерживаться *in vitro*, проявляя свойства типичной, вполне злокачественной опухоли без выраженных признаков дифференцировки, что вполне соответствует ее происхождению из недифференцированных герминальных клеток. В перевиваемых тератокарциномах могут возникать очаги зрелых тканей, причем изолированные клетки этой опухоли могут дифференцироваться по нескольким направлениям, демонстрируя классические свойства полипотентной стволовой клетки [12]. При серийных пассажах *in vitro*, без признаков дифференцировки клетки культуры могут быть индуцированы ретиноевой кислотой к дифференцировке в различные ткани [13]. Наиболее демонстративно дифференцировочные потенциалы тератокарцином проявлялись в классических опытах Минц, когда клетки недифференцированной тератокарциномы помещались в бластоцисту мышинного эмбриона и развивалась химерная мышца, состоящая из вполне нормальных тканей, возникших из клеток эмбриона и тератокарциномы. Более того, такие мыши давали нормальное потомство, несущее маркерную мутацию, имеющуюся в тератокарциноме [14]. Эти исследования дали наиболее демонстративные доказательства сохранения опухолью способности к дифференцировке.

Реверсии низкодифференцированных опухолей к более дифференцированным или высокодифференцированным формам были показаны для культур гепатом [15] и рака молочных желез [16]. В этих случаях применялись индуцирующие дифференцировку воздействия – трансфекция специфическим для печени транскрипционным фактором HNF-4 в случае гепатом [15] и воздействие антителами к интегринам при раке молочных желез (РМЖ) [16]. Так или иначе очевидно, что в обоих случаях опухоль сохранила способность к органотипической дифференцировке. Почему карциномы не утрачивают эту

способность, сказать в настоящее время невозможно. Можно лишь указать на отдельные, частные причины, требующие сохранения тканеспецифических функций, а следовательно, и тканеспецифической дифференцировки. Это сохранение гормональной зависимости в опухолях гормонально-зависимых тканей, например при РМЖ [17] или раке простаты (РП) [18]. В обоих случаях, по крайней мере на ранних стадиях прогрессии, сохраняются рецепторы к эстрогенам (РМЖ) и андрогенам (РП), которые обеспечивают само существование соответствующих опухолей, не участвуя в процессе собственно трансформации. В процессе эволюции этих опухолей они могут утрачивать гормональные рецепторы, что увеличивает степень их автономности.

Другими случаями сохранения исходных особенностей ткани являются ауто- и паракринная стимуляция опухолевого роста [19]. Однако наиболее полно проблемы взаимодействия трансформации и дифференцировки изучены для опухолей кроветворной системы.

### ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ОПУХОЛЕВЫЙ ФЕНОТИП В ГЕМОБЛАСТОЗАХ

Опухоли гемопозитической системы представляют собой наиболее яркий пример сохранения дифференцировочного статуса нормальных клеток при их опухолевой трансформации. Так, самая детальная классификация лейкозов и лимфом основана на их иммунофенотипировании, т.е. на сохранении ими дифференцировочных CD-антигенов (CD-cluster differentiation), характеризующих определенное направление и стадию дифференцировки клеток кроветворной системы [20]. Более того, некоторые дифференцировочные антигены, такие как CALLA (CD10), были первоначально обнаружены в лейкозах и рассматривались как специфические опухолевые антигены и лишь впоследствии они были выявлены на быстропреходящих стадиях нормальной дифференцировки [21]. Случаи сочетания дифференцировочных антигенов разных клеточных линий в некоторых низкодифференцированных острых лейкозах также оказались соответствующими ранним стадиям дифференцировки гемопозитических клеток, в которых еще не установилась определенная программа дальнейшего развития и присутствуют элементы разных линий гемопозитической дифференцировки [22]. Дифференцировочный статус гемопозитических новообразований более всего соответствует концепции онкогенеза как «замороженной» стадии онтогенеза, т.е. сохране-

нию опухоли направления и стадии дифференцировки клетки-предшественницы [7, 23]. Такое «замораживание», конечно, не означает однородной дифференцировки всех клеток в популяции, а скорее относится к характеристике стволовой клетки опухоли при ее возникновении из коммитированной, полустволовой гемопоэтической клетки. Стволовая же клетка лейкоза способна к большей или меньшей дифференцировке, проявляющейся в разной степени зрелости клеток в опухолевой популяции.

Сохранение гемобластомом состояния выраженной дифференцировки представляется загадочным и нелогичным. Почему и зачем? Ведь опухоль в процессе прогрессии, в основе которой лежит отбор на автономность и неконтролируемую организмом пролиферацию, должна терять и теряет все «архитектурные излишества», которые не являются ей необходимыми для выживания и агрессии. И онкогены, определяющие злокачественный фенотип опухоли, направлены в первую очередь на автономизацию клеточного цикла, на его выход из-под контроля сдерживающих механизмов [24]. Ярким примером перехода лейкоза из относительно доброкачественной хронической формы в низкодифференцированную *острую* форму является бластный криз при хроническом миелоидном лейкозе (ХМЛ). Однако и в этом случае клетки бластного криза сохраняют фенотип незрелых миелоидных, лимфоидных или эритроидных предшественников [25]. Совсем уж очевидно, что продукция иммуноглобулинов плазмочитами не способствует ни их пролиферации, ни диссеминации. Однако же она не утрачивается. Следовательно, сохранение дифференцировочного статуса требуется, вероятно, для поддержания, а может быть, и для создания, опухолевого фенотипа. Альтернативная возможность заключается в том, что дифференцировочный статус является «побочным», но трудно отделимым следствием функционирования онкогена. Так, если протоонкоген в физиологических условиях контролирует клеточный цикл и одновременно переход к более высокой ступени дифференцировки, то его превращение в автономно функционирующий онкоген будет активировать (либо поддерживать) оба процесса или состояния клетки. Естественно, что обе возможности не являются взаимоисключающими. Здесь возникает ряд вопросов, ответы на которые будут обсуждены в настоящем разделе: какова возможная связь механизмов дифференцировки с созданием и поддержанием опухолевого фенотипа гемобластомов, насколько способны опухоли кроветворной системы к повышению уровня и к индукции дифференцировки и можно ли использо-

вать дифференцировочные потенции лейкозов и лимфом в их терапии?

### О СВЯЗИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Дифференцировка клеток определенного типа сводится к экспрессии в них комплекса генов, специфичных для данной клеточной линии. Экспрессия этих генов в свою очередь контролируется регуляторными районами гена – *промоторами* и *энхансерами*. С промотора начинается транскрипция гена, для чего помимо РНК-полимеразы II требуются и активирующие факторы. Энхансеры – регуляторные районы ДНК, расположенные на некотором расстоянии от контролируемых ими генов, но в том же локусе хромосомы. Активация энхансеров и регуляторных участков промотора ведет к резкому увеличению активности гена, т.е. к усилению скорости его транскрипции. Активация же промоторов и энхансеров происходит при их специфическом взаимодействии с тканеспецифическими ядерными транскрипционными факторами (ТФ), набор и специфичность которых определяют направление и уровень дифференцировки данной клеточной линии. Для того чтобы промоторы и энхансеры тканеспецифических генов могли взаимодействовать с ТФ, они должны быть «открытыми», т.е. не блокированными белками хроматина, который «закрывает» энхансеры и гены, неактивные в клетках данного типа [26].

Таким образом, дифференцировка клеточной линии осуществляется путем взаимодействия набора тканеспецифических ТФ с энхансерами и промоторами тканеспецифических генов. Это взаимодействие приводит к экспрессии дифференцировочных генов, определяющих специфичность данной клеточной линии. Как образуется набор специфичных для данной ткани ТФ и чем контролируется конфигурация хроматина, «разрешающая» взаимодействия ТФ с энхансерами и промоторами, а РНК-полимеразы II с промоторами генов в разных клеточных типах, – это вопросы, находящиеся в процессе активного исследования.

Особенно важны для понимания роли дифференцировки в лейкемогенезе так называемые «мастер-гены», контролирующие узловые точки кроветворения. Мастер-гены активируют синтез целых блоков тканеспецифических ТФ, определяющих в конечном счете экспрессию генов, специфичных для данных клеточных линий.

Такими мастер-генами в гемопоэтической системе являются *PUI* и *LMO2*, контролирующие возникновение *всех* линий миелоидной

дифференцировки, *GATA* – мастер-ген эритроидной дифференцировки и *IKAROS* – критический ген для развития общего предшественника Т- и В-лимфоцитов [27–29].

В каждой конкретной линии миелоидной и лимфоидной дифференцировок функционируют либо свои, специфические для них мастер-гены, например *E2A/PAX5/Id* в В-клеточной дифференцировке, либо сочетание мастер-генов более общего характера, как в случае начальных стадий Т-клеточной дифференцировки [27, 28]. Эти гены играют особую роль в возникновении острых лейкозов – их участие в злокачественной трансформации будет специально рассмотрено при обсуждении соответствующих гемобластозов.

Переходя к вопросу о связи опухолевой трансформации клетки с ее дифференцировкой, мы можем переформулировать его как вопрос об участии упомянутых выше факторов дифференцировки в создании или поддержании злокачественного фенотипа клетки, т.е. с активацией протоонкогенов или инактивацией генов-супрессоров опухоли [24].

### АКТИВАЦИЯ ПРОТООНКОГЕНА ПРИ ТРАНСЛОКАЦИИ ЕГО В РАЙОН ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО (Ig) ГЕНА ИЛИ ГЕНА Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TCR)

Классической системой, четко определившей связь активации клеточного протоонкогена с основными факторами В-клеточной дифференцировки, явилась лимфома Бэркитта (ЛБ). Здесь было показано, что активация клеточного протоонкогена *c-MYC* и выход его из-под влияния контролирующих систем клетки тесно связаны с механизмами дифференцировки В-лимфоцита. Определяющим событием в трансформации В-лимфоцита при ЛБ является транслокация (t) онкогена *c-MYC* в район гена *IgH* – *t*(8; 14)<sup>1</sup>, либо гена *Igk* – *t*(2; 8), либо *IgL* – *t*(8; 22) [30–32].

В этиологии африканской лимфомы Бэркитта исходную роль играет герпесоподобный вирус Эпштейна–Барр (ЭБВ). Заражение дифференцирующейся В-клетки вирусом ЭБВ ведет к ее пролиферации при продолжающейся дифференцировке в зрелую В-клетку. Происходящая при этом сборка вариабельных (V) генов тяжелых (*IgH*) и легких (*IgL*) цепей Ig осуществляется путем генетической рекомбинации фрагментов *V<sub>H</sub>*- и *V<sub>L</sub>*-генов. Эта рекомбинация начинается на стадии пре-В-лимфоцита специфическими

<sup>1</sup> Цифры в скобках – номера хромосом в порядке возрастания.



ферментами – рекомбиназами. При рекомбинациях возникают ошибки, при которых в район генов Ig (14, 2 и 22 хромосомы соответственно *H*-, *L $\kappa$* - и *L $\lambda$* -генов) переносится фрагмент хромосомы 8, содержащий по месту разрыва ген *c-MYC*, имеющий сходные последовательности с сигнальными последовательностями фрагментов Ig-генов<sup>2</sup>. В результате вероятны ошибки рекомбинации, при которых *c-MYC* встраивается в район гена *IgH* или *IgL*. При этом ген *c-MYC* оказывается в районе активированных в В-клетках *IgH*- или *IgL*-энхансеров, что обеспечивает его непрерывную (конститутивную) экспрессию.

Очевидно, и сам процесс транслокации в данной системе является тканеспецифичным, поскольку «использует» физиологические рекомбинации, свойственные В-клеткам. Важно отметить, что перенос хромосомы 8, содержащей *c-MYC*, происходит в те участки хромосом 14, 2 и 22, которые являются «открытыми» в В-лимфоцитах. Таким образом, все три дифференцировочных фактора – специфические ТФ, энхансеры и конфигурация хроматина – задействованы в опухолевой трансформации В-лимфоцита при ЛБ. Более того, и сама рекомбинация, ведущая к трансформации, является процессом, специфичным для дифференцировки В-клеток.

Очевидно, что активность Ig-энхансеров является ведущим фактором не только в процессе трансформации В-клетки, но и в поддержании опухолевого фенотипа ЛБ. И этот фенотип не отделен от дифференцировочного статуса В-клетки и базируется на нем. Эта картина установлена для эндемичной африканской лимфомы, развивающейся на фоне инфекции ЭБВ и тропической малярии. В редких случаях спорадической ЛБ перенос *c-MYC* в локус *IgH* раздвигает *c-MYC* с энхансером *IgH*. Однако Ig продолжает активную тканеспецифическую экспрессию, которая уже не требует классического Ig-энхансера. Эта *IgH*-экспрессия распространяется и на *c-MYC* [32].

Очень близкая ситуация имеет место при фолликулярной В-клеточной лимфоме человека [31]. В этой опухоли ген *BCL-2*, блокирующий в клетке путь к апоптозу [24], переносится транслокацией в район действия энхансера *IgH* и переходит в состояние перманентной активации. *BCL-2* удерживает В-клетки от апоптоза и тем самым создает один из механизмов их бессмертия, что является обязательным признаком злокачественной опухоли [34]. Очевидно, и здесь участвуют все три фактора дифференцировки и

поддержание трансформированного фенотипа клетки неотделимо от ее дифференцировочного статуса. В случае фолликулярной лимфомы ее тканевая специфичность определяется не только необходимостью активации *IgH*-энхансера, но и тем, что *BCL-2* сам входит как специфический компонент В-лимфоцитов в цепь событий иммуногенеза, обеспечивая длительную жизнь В-клеткам памяти [35].

Обращает на себя внимание, что *BCL-2* не стимулирует пролиферацию клеток, а трансгенные по *BCL-2* мыши являются лишь «группой высокого риска» для фолликулярной лимфомы. Необходимы добавочные мутации, чтобы на фоне В-клеточной гиперплазии, вызванной гиперэкспрессией *BCL-2*, возникла фолликулярная лимфома [32, 36].

Участие *IgH*-локуса в транслокациях, специфически связанных с малигнизацией В-лимфоцитов, проявляется во многих других В-клеточных лимфомах: так, транслокации *t*(14; 19) и *t*(11; 14) типичны для определенных форм лимфом, что дало основание искать новые протоонкогены в местах стыка хромосом 19 и 11 с хромосомой 14, где локализован функционирующий *IgH* [31, 32].

Так были выявлены протоонкогены *BCL-1* и *BCL-3*. *BCL-1*, локализованный в хромосоме 11, в месте ее разрыва при *t*(11; 14), оказался идентичным гену *PRAD-1* (Parathyroid adenoma), представляющему собой один из регуляторов клеточного цикла – циклин D1. Его активация при *t*(11; 14) характерна для 50% лимфом зародышевых центров [31, 37].

Протоонкоген *BCL-3* был выявлен при *t*(14; 19) в клетках хронической лимфатической лейкемии (ХЛЛ). Активация этого протоонкогена наблюдается при пролиферации В-лимфоцитов и в этом, по-видимому, заключается его вклад в патогенез ХЛЛ [31].

Очень своеобразный случай описан для транслокации *t*(1; 14) при лимфоме, ассоциированной со слизистой кишечника. Здесь под влиянием энхансера гена *IgH* попадает ген *BCL-10*, стимулирующий апоптоз в поврежденных (мутантных) клетках. Находясь в районе *IgH*, где гипермутации являются физиологическим механизмом иммуногенеза, ген *BCL-10* мутирует с повышенной частотой и утрачивает свою нормальную функцию. По-видимому, по этой причине инактивированный *BCL-10* способствует выживанию мутировавших клеток, создавая тем самым условия для возникновения опухолевого клона [38].

Ситуация, аналогичная ЛБ, – транслокация *c-тус* в район *IgH*-энхансера – имеет место при плазмацитоме мышей [31]. В этом случае ошибка рекомбинации возникает скорее всего при

<sup>2</sup> Сигнальные последовательности – короткие участки ДНК, примыкающие к фрагментам V-гена (*V*, *D*, *J*), объединяющимся в процессе дифференцировки в единый *VDJ*- или *VJ*-ген. Сигнальные последовательности узнаются рекомбиназами, осуществляющими сборку V-гена [33].

образовании В-клеток памяти, сопровождаемемся второй рекомбинацией – переносом собранного уже *VDJ*-гена в районы генов, определяющих синтез Ig вторичного ответа (преимущественно IgA). В этом случае *c-myc* попадает в район того же Ig-энхансера, что и при ЛБ, но перенесенного к  $\alpha$ -гену.

Принципиально сходный случай описан для Т-клеточной лимфомы человека, несущей транслокацию *t*(8; 14) в районе локализации локуса  $\alpha$ -цепи антиген-распознающего рецептора Т-клеток (*TCR*) в хромосоме 14 и *c-MYC* в хромосоме 8 [37].

Таким образом, активация протоонкогена транслокацией его в район тканеспецифического Ig или *TCR*-энхансера – один из типичных и часто встречающихся путей, связывающих опухолевую трансформацию с клеточной дифференцировкой. Этот путь особенно характерен для лимфатических лейкозов и лимфом, где генетические рекомбинации являются ведущим фактором дифференцировки. Причем речь здесь идет об онкогенах «классического» типа, прямо ведущих к автономизации клеточного цикла (*MYC*, *PRAD*, *BCL-3*) или к бессмертию клетки (*BCL-2*).

Особым путем опухолевой трансформации для лимфатических лейкозов, возникающих на основе транслокации с участием Ig- или *TCR*-локусов, является активация транскрипционных факторов, контролирующих процессы дифференцировки. Семейство таких факторов активируется в Т-лейкозах при транслокациях *t*(11; 14), *t*(14; 19), *t*(1; 14) и *t*(10; 14) [31, 32, 39].

Важно подчеркнуть, что здесь в некоторых случаях активируются ТФ, нормально действующие в нервных клетках или клетках печени [31].

Вовлечение дифференцировочных ТФ не на своем месте или не в свое время блокирует нормальный ход созревания Т-клетки, не отменяя предшествующих ступеней дифференцировки. Наиболее полно в этом отношении изучено семейство дифференцировочных генов *LMO* и контролируемых ими белков [28]. Так, белок *Lmo2*, как мы упоминали выше, является фактором, контролирующим самые первые ступени гемопоэтической дифференцировки. Его конститутивная экспрессия возникает при транслокации гена *LMO2* в район *TCR $\beta$*  в процессе рекомбинационной сборки гена *TCR $\beta$*  в Т-лимфоцитах из его *V*-, *D*- и *J*-фрагментов. Аномальная экспрессия белка *Lmo2* блокирует дифференцировку Т-клетки на ранних стадиях и является одним из необходимых этапов возникновения острого Т-клеточного лимфатического лейкоза (Т-ОЛЛ). Важно подчеркнуть, что сама по себе конститутивная экспрессия *LMO2* недостаточна для опухолевой трансформации и требуются

еще дополнительные мутации для возникновения злокачественного клона Т-ОЛЛ [28].

Т-ОЛЛ на основе транслокаций регуляторных ТФ-генов в район *TCR*-генов представляют собой довольно обширную группу острых лимфоидных лейкозов [28, 31, 36].

Таким образом, и в рассмотренной группе Т-клеточных лейкозов «используется» механизм активации генов, ведущих к опухолевой трансформации, путем их переноса в район активации тканеспецифического гена *TCR*. Следовательно, и в этом случае мы встречаемся с необходимым сочетанием активации «аномальных» ТФ с тканеспецифической дифференцировкой.

### ХИМЕРНЫЕ ГЕНЫ И «СЛИТНЫЕ» БЕЛКИ

Другим чрезвычайно важным механизмом тканеспецифичной трансформации является образование химерных генов, возникающих на границе хромосомных транслокаций.

К таким лейкозам относится острый пре-В-клеточный детский лейкоз, имеющий химерный ген *E2A/PRL*, возникающий при транслокации *t*(1; 19) [31, 40]. В этом лейкозе «слитный» белок *E2a/Prl* заменяет нормальный продукт мастера гена *E2A* и тем самым блокирует выход клетки из стадии пре-В-лимфоцита. Мастер-ген *E2A* (см. выше) контролирует синтез транскрипционных факторов *e47* и *e12*, которые взаимодействуют с энхансером *Igk*-гена и выводят В-клетку из стадии пре-В-лимфоцита на стадию незрелого В-лимфоцита, синтезирующего полную молекулу мембранного IgM. «Слитный» *E2a/Prl* способен соединяться с соответствующим энхансером, но цепь последующих событий искажена *Prl*-фрагментом слитного белка. Блок дифференцировки является необходимым, хотя, возможно, и не единственным событием в злокачественной трансформации В-клетки. Очевидно, что и эта форма В-ОЛЛ «обязана» сохранять избранный путь дифференцировки, на котором только и может проявиться блокирующая активность химерного гена, – определяющего компонента трансформации пре-В-лимфоцита.

Принципиально сходная ситуация имеет место при В-ОЛЛ, ассоциированном с *t*(17; 19) [41]. В хромосоме 19 локализован ген *E2A*, а в 17 – по месту объединения с хромосомой 19 – ген *HLF*, кодирующий белок, сходный с трансфакторами, специфичными для печени и почек. Химерный ген *E2A/HLF* активируется в В-лимфоцитах, контролирует синтез слитного белка *E2a/Hlf*. Этот белок, аналог *E2a*, включается в дальнейшую программу развития пре-В-лимфо-

цита, но благодаря фрагменту *Hlf* блокирует и искажает ее.

Переходя к миелоидным лейкозам, вначале остановимся на первом и классическом примере химерного гена – *BCR-ABL*, возникающем при транслокации *t*(9 : 22) (филадельфийская хромосома) – абсолютном цитогенетическом маркере ХМЛ [25]. Эта транслокация в зависимости от ее точного положения ведет к синтезу одного из двух вариантов слитного белка – p210 или p190. Первый является маркером собственно ХМЛ, второй – ассоциирован с ОЛЛ [31]. Ген *BCR-ABL* конститутивно экспрессирован в ХМЛ. При этом *BCR* сообщает химерному гену промотор, а *ABL* является классическим протоонкогеном, в норме выполняющим функцию тирозинкиназы – компонента главных клеточных сигнальных путей.

Функции *Bcr-Abl* p210 еще окончательно не установлены, но уже ясно, что его трансформирующий эффект при ХМЛ реализуется только в миелоидной линии дифференцировки, хотя филадельфийская хромосома обнаруживается во всех линиях и на всех уровнях гемопоэза, начиная со стволовой клетки [25, 29]. О том же говорят опыты по трансплантации облученным мышам клеток костного мозга мышей, трансфицированных геном человеческого *BCR-ABL*. В этих опытах у мышей возникал ХМЛ, что говорит о *BCR-ABL* как о причине ХМЛ и об избирательном эффекте этого гена именно в миелоидной линии дифференцировки [42].

В миелоидной линии дифференцировки ХМЛ *Bcr-Abl* блокирует апоптоз, стимулирует автономную пролиферацию, независимую от ростовых факторов, и индуцирует макрофагальную дифференцировку [43]. Благодаря этому происходит неограниченное накопление миелоидных клеток, созревающих, но не уходящих в апоптоз. ХМЛ, следовательно, является как бы доброкачественной опухолью, пока дополнительные мутации не «отрежут» миелоидной ветви дифференцировки от трансформированного предшественника и не превратят ХМЛ в острый бластный криз.

Таким образом, собственно ХМЛ неотделим от дифференцировочного статуса миелоидной линии, в которой, очевидно, и может только реализоваться биологический эффект *BCR-ABL* и в которой этот химерный ген функционирует и вызывает одновременно пролиферацию и дифференцировку.

Пожалуй, самой яркой и наиболее ясной системой трансформирующей способности химерного гена и слитного белка является система *PML-RAR $\alpha$*  (promyelocytic leukemia – retinoic acid receptor  $\alpha$ ) – следствие транслокации *t*(15; 17) [29, 44, 45]. *PML-RAR $\alpha$*  является аналогом

гена *RAR $\alpha$* , кодирующего нормальный ядерный рецептор (Rar) ретиноевой кислоты (РК), – одного из наиболее активных и универсальных индукторов дифференцировки. Rar входит в комплекс ядерных белков, включающих ТФ дифференцировки миелоцита и ферменты ацетилирования и деацетилирования гистонов. Этот комплекс является репрессорным по отношению к генам миелоидной дифференцировки. На стадии промиелоцита РК связывается с Rar, обладающим высоким сродством к ней. Образование Rar-РК ведет к инактивации репрессорного комплекса, блокирующего дифференцировочные гены, что «разрешает» дальнейшую дифференцировку промиелоцитов. Слитный белок Pml-Rar входит в репрессорный комплекс, но обладает очень низким сродством к РК и не связывает ее при ее физиологических концентрациях. Физиологический блок дифференцировки не снимается репрессорным комплексом, содержащим Pml-Rar. Клетка не выходит в дифференцировку, оставаясь промиелоцитом. На основе популяции клеток, содержащих химерный ген *PML-RAR $\alpha$* , возникает промиелоцитарный острый лейкоз. Здесь, правда, остаются неясными два важных момента – как индуцируется пролиферация промиелоцита и как возникает бессмертная линия собственно лейкоза в *PML-RAR $\alpha$* -положительной популяции клеток. В этой системе, так же как и в ХМЛ, одного слитного белка для клинического заболевания недостаточно [44].

Очень важным следствием и одновременно блестящим подтверждением данной картины является терапевтический эффект больших доз РК, компенсирующих низкое сродство к нему Pml-Rar (см. ниже).

Мы же в этой системе вновь видим, как нормальные физиологические механизмы, обеспечивающие дифференцировку, становятся критическими факторами возникновения лейкоза и поддержания его опухолевого фенотипа.

В этом разделе рассмотрены наиболее изученные и типичные случаи образования химерных генов, ведущих к лимфоидным или миелоидным гемобластозам. Полный список гемобластозов, возникающих на основе хромосомных транслокаций, читатель найдет в обзорах [29, 31, 40, 46]. При этом 45% ОЛЛ и 45% ОМЛ ассоциированы со специфическими для определенных форм транслокациями [40].

Общий принцип здесь состоит в том, что при активации или инактивации мастер-гена, обычно стоящего в самом начале дифференцировки клеточной линии, возникает острый лейкоз, в то время как активация гена, контролирующего пролиферацию или апоптоз, как правило, ведет к хроническому гемобластозу [46].

Транслокация протоонкогена в район действия тканеспецифического энхансера, мутация протоонкогена, относящегося к дифференцировочным ТФ, и образование химерных генов не исчерпывают путей опухолевой трансформации, включающих механизмы дифференцировки.

Индукция «аутокринной петли» онкогенными вирусами, выводящей опухоль в автономный режим существования в организме, – еще один путь, использующий статус дифференцировки. Такой путь показан для Т-клеточного лейкоза человека, ассоциированного с вирусом HTLV-I [47]. Вирусный ген – *рХ* – контролирует синтез белка *р40*, вызывающего активацию Т-клетки и продукцию ею IL-2 – ростового фактора Т-клеток – с одновременной индукцией IL-2 рецептора. Оба компонента – рецептор и IL-2 – специфические продукты Т-клеточной дифференцировки. Стимуляция Т-клетки собственным ростовым фактором приводит к ее пролиферации и уходу от апоптоза. Аутокринный рост – исходный этап возникновения и прогрессии Т-клеточного лейкоза. Очевидно, что и этот механизм включает дифференцировочный статус Т-клетки и неотделим от него.

Сохранение дифференцировочного статуса при всех формах гемобластозов (о чем было сказано в начале главы) свидетельствует скорее всего и о других возможных формах взаимодействия трансформации и дифференцировки – таких, например, как паракринная регуляция, основанная на тканеспецифических механизмах. О том же говорит и клеточная специфичность в возникновении и проявлении биологического эффекта при многих транслокациях, ведущих к опухолям [48].

### ИНДУКЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ. ВЫХОДЫ В ТЕРАПИЮ

Ряд классических клеточных линий, поддерживаемых *in vitro*, имеет гемопоэтическое происхождение. Так, клеточная линия К-562 ведет свое начало от большого ХМЛ с бластным кризом, имеющим элементы эритробластной дифференцировки. Она сохраняет низкие уровни маркеров эритроидной дифференцировки.

Низкодифференцированные клеточные линии HL-60 и U-937 ведут начало от промиелоцитарной и моноцитарной лейкемии. Эти линии, в течение многих лет поддерживаемые в культуре ткани и не проявляющие четких признаков дифференцировки, тем не менее сохраняют способность к выражению продвижению к зрелым формам.

Так, К-562 при действии диметилсульфоксида (DMSO) дифференцируется в эритроидном направлении до стадии ретикулоцита, синтезируя Hb и гликофорин – маркеры далеко продвинутого эритроидного созревания [49, 50]. DMSO – низкомолекулярное соединение, широко применяемое для индукции дифференцировки в самых различных клеточных линиях гемопоэтического или эпителиального происхождения. Таким же эффектом обладает ретиноевая кислота (РК) и промотор канцерогенеза – форболовый эфир (ТРА) – индукторы дифференцировки различных клеточных линий.

РК, ТРА и фактор некроза опухолей (TNF) вызывают макрофагальное созревание клеточных линий HL-60 [49, 51, 52] и U-937 [44, 51], при котором клетки меняют свою морфологию, подобно макрофагам становятся прилипающими к пластику и экспрессируют типичные макрофагальные маркеры [49, 51, 52].

В-Клеточные гемобластозы также способны к повышению уровня дифференцировки и в некоторых случаях до плазматических клеток. Так, клетки макроглобулинемии могут спонтанно дифференцироваться *in vitro* с образованием плазматических клеток [53]. Клетки от 25 пациентов с различными неходжкинскими лимфомами при обработке их РК или интерфероном  $\alpha$  (Int- $\alpha$ ), или их сочетанием повышали степень своей дифференцировки до секреции Ig [54]. Особенно демонстративны опыты по индукции Ig-секретирующих плазмочитом при взаимодействии клеток мышиных В-лимфом с Т-лимфоцитами *in vivo* [55].

Особая глава по дифференцировке кроветворных клеток, в первую очередь миелоидных, была создана классическими исследованиями Меткафа [56, 57], в которых был идентифицирован ряд ростовых факторов, действующих на критических стадиях и в разных линиях миелопоэза [58]. В этих исследованиях была показана и возможность терминальной дифференцировки клеток миелоидных лейкозов *in vitro* под влиянием ростовых факторов миелопоэза [59]. Одновременно с Меткафом серию исследований по индукции дифференцировки лейкозов животных и человека (главным образом миелоидных) с помощью естественных ростовых факторов осуществил Сакс [60, 61]. Он показал принципиальную возможность значительного повышения уровня дифференцировки клеток миелолейкозов вплоть до зрелых терминальных форм *in vitro* и *in vivo*.

Эти исследования создали перспективу терапии лейкозов путем индукции в них терминальной дифференцировки и на этом пути уже есть впечатляющие достижения.

Наиболее яркими результатами такой «дифференцировочной» терапии является лечение волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ) *Int-α*, промиелоцитарного лейкоза (ПМЛ) – РК и отчасти ХМЛ  $\alpha$ -интерфероном.

В первом случае – ВКЛ, который является В-клеточным лейкозом, под длительным воздействием *Int-α* – сильного регуляторного цитокина – дает продолжительные ремиссии [62–64]. *Int-α* – белок, продуцируемый лейкоцитами, обладающий сильным противовирусным действием и стимулирующий активацию и дифференцировку многих клеток иммунной системы. Механизм терапевтического действия *Int-α* на ВКЛ не вполне ясен. Но наиболее вероятно, что воздействие *Int-α* повышает уровень дифференцировки ВКЛ и выводит его из стадии, чувствительной к ростовым факторам, на более зрелую стадию, к этим факторам не чувствительную [62, 64].

Поразительным эффектом на ПМЛ обладает РК, о чем мы уже упоминали выше. Рецептор РК (*Raα*) – ядерный белок, входящий в репрессорный комплекс с ТФ дифференцировочных генов. В клетках ПМЛ образуется химерный ген *PML-RARα*, контролирующий белок *Pml-Rar*, обладающий низким сродством к РК и не способный функционировать при физиологических ее концентрациях. Большой избыток РК восстанавливает функцию слитного *Pml-Rar* и снимает блок дифференцировки промиелоцитов. ПМЛ дифференцируется в терминальные формы с ярко выраженным клиническим эффектом [44, 45].

Применение *Int-α* при ХМЛ, хотя и не столь эффективно, но в некоторых случаях также дает отчетливый клинический результат, особенно если терапия начинается рано, проводится длительно и в сочетании с другими воздействиями [25]. Самое важное при успешном лечении ХМЛ *Int-α* – это исчезновение клона с филадельфийской хромосомой. Очевидно, что *Int-α* в этих случаях оказывает нормализующее (дифференцирующее?) воздействие как на аномальный клон клеток, так и на кроветворную систему, испытывающую подавляющее действие опухолевого клона. Полная ремиссия наблюдается редко и рецидив вновь содержит филадельфийскую хромосому.

Очень обнадеживающим представляется новый «дифференцировочный» подход, в котором используются специфические воздействия на дифференцировочный рецептор миелоидных предшественников – CD44, взаимодействующий с гиалуроновой кислотой, к чему отчасти и сводится потребность этих клеток в специфическом микроокружении. Оказалось, что воздействие на CD44 *in vitro* моноклональными антителами к нему или гиалуронатом – активным фрагмен-

том гиалуроноовой кислоты – индуцирует дифференцировку во всех формах острых миелоидных лейкозов [65]. Эта работа открывает широкие перспективы для универсальной дифференцировочной терапии острых миелоидных лейкозов.

Таким образом, попытки лечения лейкозов индукцией дифференцировки представляются чрезвычайно важными и перспективными.

Приведенные здесь факты и соображения свидетельствуют о том, что сохранение гемобластозами дифференцировочного статуса клетки-предшественницы неслучайно. Опухолевая трансформация кроветворных клеток, по крайней мере во многих системах, включает механизмы нормальной дифференцировки и как бы опирается на них. Эти механизмы работают как в самом процессе трансформации (ошибки физиологических рекомбинаций), так и в поддержании опухолевого фенотипа (активация протоонкогена энхансерами, блокировка созревания клетки, индукция дифференцировки слитным белком). Тесное взаимодействие трансформации и дифференцировки является, по-видимому, уникальной особенностью гемобластозов и создает возможности их дифференцировочной терапии.

### О ПРИЧИНЕ РАЗЛИЧИЙ В ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОМ СТАТУСЕ ГЕМОБЛАСТОЗОВ И КАРЦИНОМ

Сохранение признаков дифференцировки и дифференцировочных потенций свойственны, как мы стремились показать, и карциномам и гемобластозам. При этом для гемобластозов это сохранение носит характер «замораживания» на стадии, где произошла опухолевая трансформация клетки-предшественницы, и в опухоли она продолжает свое существование в том же дифференцировочном статусе. Трансформация в этом случае не требует снижения уровня дифференцировки клетки и не только вполне совместима с дифференцировкой, но даже использует ее механизмы. Межклеточные отношения не играют существенной роли ни в самой трансформации, ни в прогрессии гемобластозов. Их клетки подвижны, они вступают лишь во временные контакты со стромой, эндотелием или друг с другом, обмениваясь информацией посредством цитокинов.

В карциномах «акценты» расставлены иначе. Трансформация клетки может происходить и, по-видимому, происходит с участием или без участия механизмов дифференцировки [24], но прогрессия с самых ранних стадий опухолевого



процесса требует нарушения межклеточных взаимодействий, тесно связанных с дифференцировкой. Одно из основополагающих положений в области фундаментальной онкологии – разделение *инициации* и *промоции* в развитии опухоли [26]. Если инициация сводится к онкогенной мутации или к собственно трансформации, то промоция необходима для «проявления» трансформированной клетки или микроклона и превращения его в явную, растущую опухоль. Инициаторами являются химические или физические канцерогены, обладающие мутагенными свойствами, а промоторами – физиологически активные вещества, не вызывающие трансформацию, но способствующие выявлению трансформированных клеток. К ним, например, относятся кротоновое масло, форболовые эфиры, и, по-видимому, гормоны эстрогенной и андрогенной природы. Вайнберг [66] высказал предположение, что окружающая нормальная ткань сдерживает рост опухолевых клеток, как бы нормализуя их и не давая проявляться неконтролируемому росту. Такими «нормализующими» факторами, согласно Вайнбергу, могут быть взаимодействие клетки с внеклеточным матриксом (ВКМ), межклеточные связи через щелевые контакты и выделяемые нормальными клетками цитокины. Нормальное микроокружение является тем первым барьером, который должен преодолеть трансформированный клон прежде, чем превратиться в автономно растущую опухоль.

Но все эти факторы одновременно являются и главными факторами микроокружения, индуцирующими и поддерживающими дифференцировку эпителиальных клеток. ВКМ – едва ли не основной фактор, необходимый для создания и поддержания эпителиальной дифференцировки [67], межклеточные связи объединяют эпителиальные клетки в единую ткань, а цитокины, в частности TGF- $\beta$ , подавляют пролиферацию клеток. Промоторы обладают рядом физиологических активностей, блокирующих межклеточные взаимодействия, и тем самым «освобождают» опухолевый клон из-под контроля нормального микроокружения [66, 68].

Таким образом, для начала собственно опухолевого роста трансформированный клон должен изменить свои отношения с окружающими клетками – перестать чувствовать их влияние. Это может произойти в результате изменения микроокружения как при действии промоторов, так и из-за повреждения в самих трансформированных клетках, не имеющих отношения непосредственно к трансформации. Такие повреждения могут затронуть интегративную систему, ответственную за связь клетки с ВКМ [67], и это, по-видимому, является универсальным спосо-

бом освобождения трансформированной эпителиальной клетки от влияния микроокружения.

Такая ситуация наиболее глубоко изучена в системе рака молочных желез человека (РМЖ) группой Биссел [16, 69, 70]. Ими было показано, что трансформированная низкоквалифицированная линия РМЖ, бессмертная, но высокодифференцированная, обладает нормальными контактами с ВКМ и образует в трехмерном матриксе непродлиферирующие железистые структуры. Мутация в этой линии, давшая клон с гиперэкспрессией интегративного комплекса  $\beta_4/\alpha_6$ , привела к снижению уровня дифференцировки опухоли, хаотическому росту клеток без образования органотипических железистых островков [16]. Обработка мутантной линии моноклональными антителами к  $\beta_4$ -интегратину привела к снижению уровня  $\beta_4/\alpha_6$  в мутантной линии и восстановлению ее органотипического роста в трехмерном ВКМ и снижению туморогенности [16, 69]. Авторы считают, что ВКМ в данном случае, взаимодействуя с системой интегративных, оказал влияние на структуру ядерного матрикса, которая в свою очередь активировала транскрипцию тканеспецифических генов молочной железы [70].

Как бы то ни было, но совершенно очевидно, что в данном случае в системе действовали факторы, определявшие прогрессию опухолей, не имевшие прямого отношения к трансформации, но самое прямое отношение – к дифференцировке опухоли. Здесь снижение уровня дифференцировки опухоли – следствие не первоначальной трансформации клетки-предшественницы РМЖ, а необходимого этапа прогрессии опухолевого клона.

Другой пример – классическая система многоступенчатого канцерогенеза опухолей кишечника [71]. Один из ее генов – *SMAD4*, ассоциированный с супрессором опухолевого роста DCC, блокирует проведение сигнала в клетке от рецептора TGF- $\beta$ , контролирующего протоонкоген *c-MYC* и подавляющего клеточную пролиферацию. Мутация *SMAD4* в иницированном клоне полипа освобождает его от тормозящего влияния микроокружения (TGF- $\beta$ ) и способствует переходу на дальнейшую ступень прогрессии [72]. И здесь мы встречаемся с отдельным генетическим контролем инициации и прогрессии и со снижением дифференцировки опухоли, наступающим вследствие ее выхода из-под влияния микроокружения.

Критическая роль ВКМ в контроле экспрессии АФП – одного из самых характерных эмбриоспецифических опухолевых маркеров – была показана для гепатоцитов [4]. В этих клетках синтез АФП *in vivo* определяется тем, входит ли гепатоцит в структуру печеночной балки [73], а

*in vitro* – взаимодействует ли он с трехмерным ВКМ или распластан на двумерном матриксе того же состава [74]. В балке и трехмерном ВКМ синтез АФП супрессирован. Смешанная культура гепатоцитов с эпителиальными непаренхимными клетками печени (IAR) поддерживала выраженную дифференцировку гепатоцитов с полным подавлением синтеза АФП. В то же время трансформированные геном *RAS IAR* в смешанной культуре строят неполноценный матрикс, что приводит к «дифференцировке» гепатоцитов и синтезу ими АФП [75].

Эти опыты позволяют предположить, что резкспрессия опухолями печени АФП является эпифеноменом – результатом выхода трансформированных клеток печени из-под влияния нормального микроокружения и в первую очередь ВКМ [76]. Роль интегринов в этой системе представляется наиболее вероятной.

Другим, очень выразительным примером выхода опухоли из-под влияния регулирующих систем с кажущейся утратой тканевой специфичности является утрата раком простаты гормональной зависимости. В этом случае было показано, что сигнал, индуцируемый андрогеном при связывании с рецептором гормона, начинает генерироваться неродственным рецептором *Her2/neu* или внутриклеточным белком, усили-

вающим эффект минимальных количеств гормон-рецепторного комплекса [77]. Гиперпродукция этого фактора усиления сигнала создает независимость от физиологических концентраций андрогена и тем самым способность к существованию при резком снижении уровня специфического рецептора. Следовательно, в этой системе имеет место снижение уровня дифференцировки опухоли при сохранении ею дифференцировочных механизмов. Таким образом, в карциномах мы встречаемся с ситуациями, когда собственно трансформация может «замораживать» клетку на ранней или весьма продвинутой ступени дифференцировки, но необходимая для проявления опухоли прогрессия выводит ее из системы межклеточных взаимодействий с неизбежным снижением уровня дифференцировки, зачастую (или как правило) без утраты ее дифференцировочных потенций. И этим определяются сходство и различие карцином и гемобластозов. Соединительно-тканевые опухоли (саркомы) изучены в этом отношении недостаточно.

Работа поддержана грантом Ведущих научных школ № 96-15-98082.

Автор благодарит Н.В. Иртыгу за помощь в подготовке рукописи к печати.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринштейн Дж. (1951) *Биохимия рака*, Изд-во иностр. лит., Москва.
2. Weiler, E. (1959) *Ciba Found. Symp. on Carcinogenesis, Mechanism of Action*. London, pp. 165–172.
3. Abelev, G.I. (1965) *Progr. Exp. Tumor Res.*, 7, 104–157.
4. Abelev, G.I., and Erasmer, T.L. (1999) *Semin. Cancer Biol. Tumor Markers*, 9, 95–104.
5. Abelev, G.I., and Sell, S. (1999) *Semin. Cancer Biol. Tumor Markers*, 9, 61–66.
6. Sell, S., and Pierce, G.B. (1994) *Lab. Invest.*, 70, 6–21.
7. Potter, V.R. (1978) *Br. J. Cancer*, 38, 1–23.
8. Foulds, L. (1958) *J. Chronic Dis.*, 8, 2–37.
9. Pierce, G.B., and Spears, W.C. (1988) *Cancer Res.*, 48, 1196–1204.
10. Teilum, G. (1976) *Special Tumors of Ovary and Testis*. II ed. Munksgaard, Copenhagen.
11. Pierce, G.B. (1967) *Curr. Top. Dev. Biol.*, 4, 223–246.
12. Pierce, G.B., and Verney, E. (1961) *Cancer*, 14, 1019–1021.
13. Strikland, S., Smith, K.K., and Marotti, K.B. (1980) *Cell*, 21, 347–355.
14. Mintz, B., and Ilmensee, K. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3585–3589.
15. Spath, G.F., and Weiss, M. C. (1998) *J. Cell Biol.*, 140, 935–946.
16. Wenver, V.M., Petersen, F., Wang, F., Larabell, C.A., Briand, P., Damasky, C., and Bissel, M.J. (1997) *J. Cell Biol.*, 137, 231–245.
17. Callahan, R., and Salomon, D. (1993) *Cancer Surveys*, 18, 35–36.
18. Chung, L., Gleave, M., Hsieh, J., Hong, S.-J., and Zhan, H. (1991) *Cancer Surveys*, 11, 91–121.
19. Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. (1995) in *The Molecular Basis of Cancer* (Mendelsohn, J., Howler, P., and Liotta, L., eds), W. Saunders, Phil., pp. 117–140.
20. Stevenson, G.T., and Cragg, M.S. (1999) *Semin. Cancer Biol.*, 9, 139–147.
21. Greaves, M.F., and Janossy, G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.*, 516, 193–230.
22. Enver, T., and Greaves, M.F. (1998) *Cell*, 94, 9–12.
23. Greaves, M.F. (1982) *Cancer Surveys*, 1, 189–204.
24. Копнин Б.П. (2000) *Биохимия*, 65, 5–33.
25. *Гематологическая онкология* (под ред. Волковой М.А.), 1999, Наука, Москва (в печати).
26. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. (1994) *Молекулярная биология клетки*. Гл. 10. *Контроль генной экспрессии*. Мир, Москва, с. 176–253.
27. Dorshkind, K. (1994) *Cell*, 79, 751–753.
28. Rabbits, T.R. (1998) *Genes Dev.*, 12, 2651–2657.
29. Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.O., and Zang, D.E. (1997) *Blood*, 90, 489–519.
30. Klein, G. (1982) *Cancer Surveys*, 1, 299–308.
31. Korsmeyer, S.J. (1992) *Ann. Rev. Immunol.*, 10, 785–806.
32. Showe, L.C., and Croce, C.M. (1987) *Ann. Rev. Immunol.*, 5, 253–277.
33. Max, E. (1993) in *Fundamentals of Immunology*. III ed. (Paul, W., ed.), Raven Press, N.Y., pp. 315–382.
34. Абелев Г.И. (1986) *Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева*, 31(3), 318–326.
35. Viteta, E., Berton, M., Burger, C., Kepren, M., Lee, W., and Yin, X. (1991) *Ann. Rev. Immunol.*, 9, 193–217.

36. Kossa, N., Luzer, G., and Koziner, B. (1996) *Leuk. Lymphoma*, 1-2, 163-171.
37. Finger, I.R., Harvey, R.C., Moore, R.C., Showe, L.C., and Croce, C.M. (1986) *Science*, 234, 982-985.
38. Willis, T., Jadagel, D., Du, M.-G., Peng, H., Perry, A., Abbul-Rauf, M., Price, H., et al. (1999) *Cell*, 96, 35-45.
39. Look, A.Th. (1997) *Science*, 278, 1059-1065.
40. Kamps, M.A., Murre, C., Sun, X.-H., and Baltimore, D. (1990) *Cell*, 60, 547-555.
41. Inaba, T., Roberts, W.H., Shapiro, L.H., Jolly, K.W., Raimondi, S.C., Smitt, S.D., and Look, A. Th. (1992) *Science*, 257, 531-534.
42. Daley, G., van Etten, R., and Baltimore, D. (1990) *Science*, 247, 824-830.
43. Cambier, N., Zhang, Y., Vairo, G., Kosmopoulos, K., Metcalf, D., Nocola, N., Elefanty, A. (1999) *Oncogene*, 18, 343-352.
44. Stunnenberg, H.G., Garcia-Jimenez, C., and Betz, J. L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 11423, F15-F33.
45. Guidez, F., Ivins, S., Zhu, J., Soderstrom-Waxman, S., and Zelent, A. (1998) *Blood*, 151, 2634-2642.
46. Rabbits, T.R. (1991) *Cell*, 67, 641-644.
47. Yoshida, M., and Seiki, M. (1987) *Ann. Rev. Immunol.*, 5, 541-559.
48. Barr, F.G. (1998) *Nature Gen.*, 19, 121-124.
49. Anderson, I., Jokinen, M., and Gamberg, C. (1979) *Nature*, 278, 364-365.
50. Garsia-Bermejo, L., Vilaboa, N.F., Perez, C., Calan, A., de Blas, E., and Aller, P. (1997) *Exp. Cell Res.*, 236, 268-274.
51. Rovera, G., O'Brien, T.G., and Diamond, I. (1979) *Science*, 204, 868-870.
52. Ryves, W., Dimitrievich, S., Gordge, Ph., and Evans, F. (1994) *Carcinogenesis*, 15, 2501-2506.
53. Levy, Y., Labanme, S., Gendron, M.-C., and Brouet, J.-C. (1994) *Blood*, 83, 2206-2210.
54. Bonnefoix, T., Selte, M. F., Gressin, R., Martin, J., Garban, F., Leroux, D., Renverser, J. C., and Sotto, J. (1998) *Eur. J. Haematol.*, 61, 84-92.
55. Hilbert, D.M., Rapp, U.R., and Rudikoff, S. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 649-653.
56. Metcalf, D. (1989) *Nature*, 339, 27-30.
57. Metcalf, D. (1990) *Cancer*, 65, 2185-2195.
58. Sokolovsky, M., Lodish, H., and Daley, G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6573-6575.
59. Maekawa, T., and Metcalf, D. (1989) *Leukemia*, 3, 270-276.
60. Sachs, L. (1982) *Cancer Surveys*, 1, 321-342.
61. Sachs, L. (1990) *Cancer*, 65, 2196-2206.
62. Vedantham, S., Cammel, H., and Colomb, H. (1992) *Cancer Res.*, 52, 1056-1096.
63. Smith, J.W., Longo, D.L., and Urba, W.J., et. al. (1991) *Blood*, 78, 1664-1667.
64. Gressler, V.H., Weinkan, F.F., Franklin, W.A., and Golomb, H.M. (1989) *Cancer*, 64, 374-378.
65. Charrad, R.-S., Li, Y., Delpech, B., Balitrand, B., Clay, D., Jasmin, C., Chominne, Ch., and Smadya-Ioffe, F. (1999) *Nature Med.*, 5, 669-676.
66. Weinberg, R.A. (1989) *Cancer Res.*, 49, 3713-3721.
67. Seminars in Cancer Biol. Extracellular Matrix, and Integrins, 1996, 7(3).
68. Ren, P., Mehta, P., and Ruch, R. (1998) *Carcinogenesis*, 19, 160-175.
69. Myers, C., Schmidhauser, C., Millentin-Michelotti, J., Fragoso, G., Roscelly, C., Casperson, G., Mossi, R., Pugugnet, P., Hager, G., and Bissel, M. (1998) *Mol. Cell Biol.*, 18, 2184-2195.
70. Lelcvre, S., Weaver, V., Nickerson, A., Larabel, C., Bhaumir, A., Petersen, O., and Bissel, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14711-14716.
71. Vogelstein, B., Fearon, E., Humieton, S., Kern, S., Preisinger, B., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A., and Ros, J. (1988) *New Engl. J. Med.*, 319, 525-532.
72. White, R.L. (1998) *Cell*, 92, 591-592.
73. Gleiberman, A.S., and Abelev, G.I. (1985) *Int. Rev. Cytol.*, 95, 229-266.
74. Gleiberman, A.S., Kudrjartseva, E.I., Sharovskaya, Yu.Yu., Abelev, G.I. (1989) *Mol. Biol. Med.*, 6, 95-107.
75. Kudrjartseva, E.I. (1997) *Eur. J. Cell Biol.*, 47, 36.
76. Abelev, G.I. (1999) *Tumor Biol. Abstr. XXVII ISOBM Meeting*, Kyoto (in press).
77. Vasokorpi, T. (1999) *Nature Med.*, 5, 264-265.

## DIFFERENTIATION MECHANISMS AND MALIGNANCY

G.I. Abelev

*Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoye sh. 24, Moscow, 115478; fax: (095)324-1205, E-mail: abelev(@)mx.iki.rssi.ru*

Submitted September 17, 1999

Association between differentiation and malignant transformation is discussed for carcinomas and hemoblastoses. It is demonstrated that carcinomas retained some markers of precursor tissue, while hemopoietic malignancies reflect very closely the phenotypic peculiarities of precursor cells. Both tumor types retain their ability to differentiate into mature forms. Oncogene activation as a consequence of its translocation into region of Ig or TCR genes active in B or T-cells, respectively, offers the most demonstrative example of the association between differentiation and malignant transformation. It was shown that not only the classical oncogenes, such as *MYC*, *PRAD*, *BCL2* could be activated in such way, but also heterologous differentiation transactors, not active in lymphocytes during the normal development. Their activation not in the proper time and not in a proper place leads to a number of hemoblastoses. Detailed analysis is presented of the chimeric genes and fused proteins, generated owing to chromosome fragments fusion at specific chromosomal translocations. The situations are presented where differentiation induction in hemoblastoses leads to significant therapy effect. Such hemoblastoses are: hairy cell leukemia, promyelocytic leukemia and, partly, chronic myelocytic leukemia. The role of intercellular interactions in control of initiated carcinoma cell growth and maintenance of differentiation is specially discussed. It is suggested that derangement of these interactions leads simultaneously to the promotion of tumor growth and loss of the mature phenotype of carcinoma cells. It could be the reason of carcino-embryonic proteins reappearance in some epithelial tumors.

**KEY WORDS:** differentiation in tumors, translocation in hemoblastoses, tumor progression, extracellular matrix,  $\alpha$ -fetoprotein reexpression in hepatomas.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА

### Обзор

© 2000 г. Н.Л. Лазаревич

*Институт канцерогенеза Российского онкологического  
научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115478 Москва, Каширское ш., 24; факс: (7-095) 324-1205,  
электронная почта: abelev@mx.iki.rssi.ru*

Поступила в редакцию 13.10.99

Альфа-фетопротейн (АФП) – основной компонент эмбриональной сыворотки крови млекопитающих, который синтезируется висцеральной энтодермой желточного мешка и клетками эмбриональной печени. Сразу после рождения уровень АФП в сыворотке снижается на несколько порядков. Синтез АФП возобновляется при возникновении опухолей печени и герминогенных тератобластом и в меньшей степени – при химических и механических повреждениях печени, сопровождающихся регенерацией, например при остром вирусном гепатите. Изменение уровня АФП в сыворотке является важным диагностическим признаком опухолей печени и широко используется в клинической практике. В свете изложенных выше фактов изучение молекулярных и клеточных механизмов, участвующих в регуляции онкоэмбрионального белка АФП, является важной и перспективной задачей. На различных экспериментальных моделях показано, что такая регуляция осуществляется в основном на уровне транскрипции гена АФП, уровень экспрессии которого контролируется его 5'-регуляторным районом размером 7 тыс. пар нуклеотидов. В нем выявлены тканеспецифический промотор, три независимых энхансера и репрессор, по крайней мере частично определяющий падение экспрессии гена АФП во взрослой печени. Идентифицированы связывающиеся в основном с промотором гена АФП общераспространенные и тканеспецифические транскрипционные факторы, в том числе гепатоцитарные ядерные факторы (ГЯФ), участвующие в регуляции транскрипции большинства генов печени. Однако механизмы, определяющие значительные изменения уровня синтеза АФП в процессе онтогенеза и при канцерогенезе, пока полностью не выяснены. Кроме того, в настоящее время крайне недостаточны сведения о негативных регуляторах экспрессии гена АФП, определяющих подавление экспрессии этого гена в клетках негепатоцитарного происхождения либо во взрослой печени.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** альфа-фетопротейн, гепатоцитарные ядерные факторы, регуляция транскрипции, транскрипционные факторы, гепатоцит, дифференцировка, гепатокианцерогенез

Альфа-фетопротейн (АФП) был впервые обнаружен [1] при электрофорезе эмбриональной человеческой сыворотки в первом ( $\alpha_1$ ) положении после сывороточного альбумина. В нормальной сыворотке взрослых людей этого белка не оказалось.

В 1960 г. Г.И. Абелевым и сотр. в мышинной гепатоме был обнаружен  $\alpha$ -глобулин, отсутствующий в печени, крови и других тканях нормальных взрослых мышей. Оказалось, что этот белок является одним из основных компонентов мышинной эмбриональной сыворотки и, кроме того, выявляется во взрослой печени во время регенерации [2]. Позже эмбриоспецифический  $\alpha$ -глобулин был обнаружен в сыворотке больных с гепатоклеточной карциномой [3] и тератобластомой [4]. В последующие годы стало ясно, что этот белок, названный альфа-фетопро-

теином, является важным маркером для дифференциальной диагностики этих опухолей.

АФП представляет собой полипептид длиной ~600 аминокислот, содержащий 4% углеводных остатков. Это секретируемый белок, по структуре и своим физико-химическим свойствам очень близок к сывороточному альбумину.

Функции АФП и его роль в развитии и при канцерогенезе к настоящему времени изучены недостаточно (см. обзоры [5, 6]). Важнейшими отличительными свойствами АФП являются его высокое сродство (в  $10^5$  раз выше, чем у СА) к полиненасыщенным жирным кислотам и способность связывать эстрогены. Ряд данных указывает на участие АФП в регуляции иммунного ответа.

### СТРУКТУРА ГЕНА АФП И ПРОДУКТЫ ЕГО ТРАНСКРИПЦИИ

Ген АФП входит в семейство альбуминовых генов наряду с генами СА, группспецифического

Принятые сокращения: АФП – альфа-фетопротейн, ГКР – глюкокортикоидный гормон-рецепторный комплекс, ГЯФ – гепатоцитарные ядерные факторы, СА – сывороточный альбумин.





специфичных для печени. Возможно, координированное изменение уровней экспрессии кластерно расположенных генов в процессе развития регулируется общими элементами, расположенными в межгенном пространстве.

Во взрослой печени экспрессия гена АФП обратимо подавлена. Она может возобновляться при регенерации печени, индуцированной частичной гепатэктомией, при которой хирургическим путем удаляется до 2/3 органа, или при отравлении  $\text{CCl}_4$ , вызывающем некроз гепатоцитов, прилежащих к центральным венам. Одновременно с увеличением синтеза АФП происходит падение синтеза СА. Наиболее сильно этот эффект выражен у мышей. Положение гепатоцита в печеночной балке или вне ее является определяющим фактором, регулирующим активность синтеза АФП на клеточном уровне [30]. Повышение уровня АФП в сыворотке взрослых особей наблюдается также при заболеваниях острым вирусным гепатитом и меньше при циррозах печени.

Повышение уровня АФП в крови наблюдается при первичных опухолях печени, тератокарциномах и опухолях кишечника [4, 31]. В эмбриональных карциномах, тератокарциномах, опухолях желточного мешка и гепатобластомах человека повышение уровня АФП наблюдается в 80–90% случаев и является важным диагностическим признаком. Клеточные аспекты регуляции экспрессии АФП подробно обсуждены в обзорах [6, 32].

Многие тератокарциномы и гепатомы наряду с повышением уровня АФП характеризуются сниженным уровнем синтеза СА. В то же время ряд клеточных культур, например гепатома человека Нер G2, одновременно синтезируют и АФП, и СА [33, 34]. Как и в нормальных тканях, в большинстве тератокарцином и гепатом прослеживается зависимость синтеза СА и АФП от уровня дифференцировки [34–36].

## МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АФП

Определяющим в регуляции экспрессии гена АФП является транскрипционный уровень. Это подтверждается корреляцией между количеством мРНК АФП и уровнем синтеза белка в различных системах [26, 27].

Однако полностью исключить участие посттранскрипционных механизмов в регуляции уровня синтеза АФП в некоторых случаях нельзя. Рядом авторов высказаны предположения о том, что посттранскрипционные механизмы проявляются *in vitro* [37] или играют некоторую

роль в увеличении количества мРНК в желточном мешке мышей [38] и в клетках крысиной гепатомы [39].

У мышей выявлены два генетических локуса – *Afr1 (raf)* и *Afr2 (Rif)*, которые участвуют в регуляции экспрессии гена АФП после рождения [40, 41]. Возможный механизм их действия на транскрипционном уровне будет рассмотрен ниже. Показано, что *Afr1* может влиять на стабильность транскрипта АФП и/или на его процессинг. Возможно, в этом процессе принимает участие элемент вторичной структуры 3'-конца мРНК–АФП-шпилька, которая высококонсервативна и обнаружена также в мРНК АФП человека [42].

Изучение связи уровня метилирования гена АФП или его регуляторного района с уровнем экспрессии гена дает неоднозначные результаты. В эмбриональных и взрослых гепатоцитах четких взаимосвязей между уровнем экспрессии и степенью деметилирования структурного гена АФП не прослеживается [43].

В 5'-концевом районе гена АФП и в его первом интроне картировано несколько критических сайтов [44, 45], степень деметилирования которых коррелирует с возможной или действительной активностью этого гена. С другой стороны, при падении экспрессии гена АФП в онтогенезе или при воздействии дексаметазоном уровень метилирования 5'-регуляторного района изменяется не сразу, а через несколько недель. Обработка клеток эмбриональной карциномы, а также клеток печени новорожденных крыс 5-азацитидином не приводит к активации экспрессии гена АФП [44]. По-видимому, метилирование не является ключевым механизмом регуляции экспрессии гена АФП, но отражает состояние активности гена и может стабилизировать его в неактивном состоянии.

## РЕГУЛЯТОРНЫЕ цис-ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНА АФП

С помощью трансфекционного анализа гепатомных линий [46–49] и в опытах с трансгенными мышами [22, 50–52] было показано, что элементы, определяющие уровень транскрипции гена АФП, расположены в районе от –7,6 т.п.н. до точки начала транскрипции. Между 5'-регуляторными районами гена АФП мыши, крысы, гориллы и человека обнаружена высокая гомология [53, 54].

В регуляторном районе гена АФП мышей и крыс выявлены три дистальных энхансера, промоторный элемент [46–49] и репрессор [49–51] (рис. 1).

**Промотор.** Последовательность -200/0 п.н. гена АФП характеризуется тканеспецифической промоторной активностью и содержит множественные перекрывающиеся сайты связывания общераспространенных и тканеспецифических транскрипционных факторов. *In vivo* в отсутствие энхансера промотор АФП неактивен [52]. Обращает на себя внимание значительное сходство организации промоторов гена АФП и других альбуминовых генов, в частности наличие и локализация в них ССААТ-боксов и сайтов связывания HNF1 [9, 55]. Структура промоторного района будет подробнее рассмотрена ниже.

**Энхансеры.** В регуляторном районе гена АФП крыс и мышей выявлены три независимых энхансерных элемента размером 200–300 п.н. (E1–EIII) (рис. 1) [48, 49, 56, 57].

Все эти элементы являются типичными энхансерами и способны усиливать экспрессию как с промотора АФП, так и с гетерологичных промоторов [56]. Как и промотор АФП, энхансеры тканеспецифичны и неактивны в негепатоцитарных клетках [56]. Каждый энхансер может активировать промоторы и СА, и АФП. Вероятно, на некоторых стадиях развития и в некоторых линиях гепатом, в которых неактивен собственный энхансер СА, межгенные энхансеры независимо контролируют экспрессию обоих генов, причем соответствующие промоторы благодаря взаимодействию с различными участками энхансеров не конкурируют между собой [58].

Все три энхансера крысиного гена АФП в гепатомных клеточных линиях оказывают аддитивное действие на промотор, наивысший уровень экспрессии достигается при наличии всех трех энхансеров [49]. Однако ни промотор, ни энхансеры гена АФП не достаточны для подавления экспрессии этого гена после рождения [49, 59].

Энхансеры мышинного гена АФП *in vitro* не различаются по активности и не вызывают аддитивного эффекта [48, 60]. Однако в работах на трансгенных мышах показано, что *in vivo* каждый из энхансеров характеризуется различной активностью в любой из тех тканей (желточный мешок, эмбриональные печень и кишечник), где в норме экспрессируется АФП как с собственным, так и с гетерологичным промотором [52, 61]. Мышинный EIII активен также в клетках мозга [61]. Все три энхансера потенциально активны в клетках взрослой печени мыши. E1 и EII наиболее активны в гепатоцитах, окружающих центральную вену; EIII активен только в слое гепатоцитов, прилежащих к центральной вене [61]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что одним из факторов, влияющим на экспрессию гена АФП во взрослой печени, является положение гепатоцита в печеночной дольке [30].

Отсутствие активности EIII в большинстве взрослых гепатоцитов связано, по-видимому, с существованием негативных факторов, связывающихся с этим районом [61].

Подробнее результаты, полученные при изучении регуляторных элементов гена АФП на трансгенных мышах, обсуждены в обзоре [62].

В энхансере EIII выявлены множественные сайты связывания регуляторных белков, в том числе гепатоцитарных ядерных факторов HNF3 и C/EBP (см. ниже) и ядерного рецептора COUP-TF [63], необходимые для полноценной стимуляции промотора АФП [57, 60, 64].

В регуляторном районе гена АФП человека обнаружены два энхансерных элемента: -4,0/-3,7 и -3,7/-3,3 т.п.н. В проксимальном энхансере расположен сайт связывания HNF1 [65].

**Репрессорные элементы.** У всех исследованных видов были идентифицированы репрессорные последовательности, расположенные между промотором и энхансерами гена АФП. Вероятно, они играют основную роль в подавлении транскрипции гена АФП после рождения [49–51, 65]. У трансгенных мышей удаление репрессорной последовательности -800/-250 п.н. приводит к сохранению экспрессии контролируемого энхансерами и промотором АФП трансгена в печени и кишечнике взрослых мышей [51]. Экспрессия трансгена в такой системе носит зональный характер: она наблюдается только в гепатоцитах, окружающих центральную вену [66] и определяется, вероятно, активностью энхансера EIII.

В регуляторном районе крыс репрессор также примыкает к промоторному району [49, 56]. Деления репрессора приводит к восстановлению экспрессии репортерного гена, контролируемого промотором АФП в клетках человеческой гепатомы H4C3, не экспрессирующей АФП [49]. Этот репрессор способен также подавлять активацию промотора АФП гетерологичным энхансером SV40.

В регуляторном районе гена АФП человека выявлено по меньшей мере два репрессора: -1822/-951 и -402/-169 п.н. Более сильный, дистальный, репрессор блокирует активность гомологичных и гетерологичных энхансеров в зависимости от положения и независимо от ориентации, но практически не влияет на работу промотора АФП [65].

В промоторе гена АФП мыши идентифицирована последовательность -57/-43 п.н., которая необходима для подавления экспрессии гена АФП в клетках негепатоцитарного происхождения. При взаимодействии с ядерными экстрактами, полученными из культуры эмбриональных крысиных фибробластов, эта последовательность образует три комплекса, специфичных для кле-

ток этого типа, причем один из этих комплексов выявляется в экстрактах из АФП-непродуцирующих клеточных линий как негепатоцитарного, так и гепатоцитарного происхождения [67]. Еще одна, предположительно репрессорная последовательность расположена в районе -608/-371 п.н. [67]. Негативные факторы, связывающиеся с этими последовательностями, пока не идентифицированы.

Итак, 5'-концевой район гена АФП довольно консервативен. Он содержит промотор, энхансерные и репрессорные элементы, содержащие последовательности, специфически связывающие транскрипционные факторы, и обеспечивает тонко регулируемую транскрипцию гена АФП. Прежде чем перейти к описанию транскрипционных факторов, участвующих в этом процессе, рассмотрим некоторые общие закономерности регуляции экспрессии генов, специфичных для печени.

### ГЕПАТОЦИТАРНЫЕ ЯДЕРНЫЕ ФАКТОРЫ И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ ПЕЧЕНИ

Регуляция экспрессии генов печени – крайне сложный многоступенчатый процесс. Это связано с необходимостью постоянного изменения и координации экспрессии огромного количества структурных, секреторных, транспортных белков и ферментов.

Решающую роль в регуляции, которая происходит в основном на транскрипционном уровне [27, 68], играют гепатоцитарные ядерные факторы (ГЯФ), краткому обзору которых и будет посвящена эта глава.

В настоящее время к ГЯФ относят несколько семейств регуляторных белков (HNF1, C/EBP, HNF3, HNF4 и HNF6), сайты связывания которых обнаружены в регуляторных элементах многих генов, специфичных для печени. Хотя экспрессия этих факторов не ограничивается только клетками печени, именно в этом органе выявляются максимальные количества ГЯФ. Тканевая специфичность экспрессии любого из печеночных генов достигается, по-видимому, одновременным участием нескольких гепатоцитарных факторов транскрипции в регуляции этого процесса.

**Семейство HNF1.** Члены этого семейства – HNF1 (HNF1 $\alpha$ , LFB1) [69] и vHNF1 (HNF1 $\beta$ , LFB3) [70, 71] – по структуре ДНК-связывающего домена относятся к суперсемейству гомеобелков, представители которого играют важную роль в дифференцировке различных типов клеток [72]. По своей структуре белки семейства

HNF1 выделяются в отдельную группу гомеобокс-содержащих факторов [150].

Белки семейства HNF1 являются, по-видимому, наиболее распространенными регуляторами экспрессии печеночных специфических генов, их потенциальные сайты связывания выявлены в регуляторных районах более чем ста генов. Чаще всего такие сайты локализованы в промоторных районах и образуют кластеры с сайтами посадки других транскрипционных факторов [73].

HNF1 и vHNF1 узнают одну и ту же последовательность и в отличие от других гомеобелков взаимодействуют с ДНК в виде гомо- или гетеродимера [71, 74]. Важную роль в стабилизации димера играет небольшой белок DCoH. Связываясь с димером HNF1, две молекулы DCoH образуют более стабильный тетрамер, обеспечивая оптимальный транскрипционный эффект [75].

Показано существование нескольких форм HNF1 и vHNF1, обладающих различными транскрипционными свойствами и неравномерно представленных в разных органах [76, 77]. Транскрипционные свойства могут изменяться и при колебаниях концентрации белка-стабилизатора димеров DCoH [78].

Экспрессия гена HNF1 контролируется комплексом как тканеспецифичных, так и общераспространенных факторов. В промоторе гена HNF1 выявлены сайты связывания HNF3 и HNF4, а также сайт AP-1 [79, 80]. Промотор vHNF1 может быть активирован ядерными рецепторами COUP-TFI/Ear3 и COUP-TFII/Atg1, рецепторами ретиноевой кислоты и в отличие от промотора HNF1 он не зависит от HNF4 $\alpha$  [81].

В процессе эмбрионального развития vHNF1 появляется раньше, чем HNF1. У мышей мРНК vHNF1 начинает экспрессироваться в висцеральной энтодерме желточного мешка не позднее, чем на шестой день развития [82], на девятый-одиннадцатый день vHNF1 выявляется в первичной кишке и в зачатке печени, на более поздних стадиях развития его синтез локализован в печени, почках и легких. HNF1 впервые появляется в зачатке печени на одиннадцатый день развития, когда в этом органе уже отчетливо выявляются мРНК АФП и СА [82, 83]. HNF1 локализован так же, как vHNF1, но уровень его экспрессии существенно ниже. После рождения картина меняется кардинальным образом: мРНК HNF1 выявляется в печени, почках, кишечнике и в поджелудочной железе, причем везде, кроме почек, в гораздо большем количестве, чем vHNF1 [70, 84, 85]. vHNF1 (но не HNF1) экспрессируется также в пищеводе, легких и щитовидной железе [71].

Значительные количества HNF1, но не vHNF1, выявляются обычно в дифференциро-

ванных гепатомных линиях. Дедифференцировка гепатом и подавление экспрессии гепатоспецифических генов обычно сопровождается падением экспрессии HNF1 и увеличением количества vHNF1 [69, 86, 87]. Индуцированная ретиноевой кислотой дифференцировка мышинной эмбриональной карциномы F9 в висцеральную энтодерму, сопровождающаяся активацией гена АФП, связана со значительным увеличением экспрессии vHNF1, но не HNF1 [81, 82].

Инактивация гена HNF1 не является летальной для мышинного эмбриона, но после рождения вызывает замедление роста, фенилкетонурию и нарушение работы печени, почек и поджелудочной железы и приводит к смерти 75% гомозиготных животных в течение 20–40 суток. Необходимо отметить, что у таких животных наблюдается значительное падение скорости транскрипции гена CA [88].

Мутации генов HNF1, его основного регулятора HNF4 $\alpha$  (см. ниже) и vHNF1 у человека ведут к нарушению системы секреции инсулина и являются причиной развития трех форм неинсулинозависимого диабета, развивающегося у молодых людей (MODY3, MODY1 и MODY5 соответственно) [89–91]. Нарушения секреции инсулина наблюдаются и у мышей с инактивированным HNF1 [92]. Инактивация гена vHNF1 ведет к смерти мышинных эмбрионов на седьмые-восьмые сутки развития, вероятно, за счет нарушения в развитии висцеральной энтодермы. Важно отметить, что у таких мышей происходит подавление экспрессии маркеров висцеральной энтодермы, в том числе АФП и HNF4 $\alpha$ .

**Семейство C/EBP.** Открытие первого представителя этого семейства, C/EBP $\alpha$  [93], позволило охарактеризовать новый класс транскрипционных факторов, связывающихся с ССААТ-боксом. Они содержат ДНК-узнающий основной домен (так называемый «bZIP»), N-концевой трансактивационный домен и спиральную структуру типа «лейциновой застёжки», обеспечивающую димеризацию. Описанные к настоящему времени члены семейства C/EBP имеют похожую структуру, образуют гомо- и гетеродимеры и связываются с общей последовательностью ДНК [70, 94]. Снижение уровня экспрессии одного из генов C/EBP может частично компенсироваться за счет изменения концентраций других факторов семейства [95]. Сайты связывания белков семейства C/EBP выявлены в регуляторных элементах генов АФП [96], CA [97], C/EBP $\alpha$  [98] и других печеночных генов.

Два белка семейства C/EBP – позитивный регулятор C/EBP $\beta$  и ингибитор транскрипции LIP – продукты одного и того же гена, их соотношение в клетке регулируется двумя механиз-

мами: либо на уровне трансляции [99], либо за счет C/EBP $\alpha$ -зависимого протеолитического расщепления C/EBP $\beta$  [100]. Гетеродимеры других белков семейства C/EBP с укороченным белком LIP, у которого отсутствует трансактивационный домен, способны подавлять транскрипцию.

мРНК C/EBP $\alpha$  впервые выявляется у мышей на тринадцатый день развития. Во взрослом организме она обнаружена в различных тканях энтодермального и мезодермального происхождения, в то время как соответствующий белок выявлен лишь в печени и жировой ткани. Сходная ситуация наблюдается при анализе спектра экспрессии большинства других представителей этого семейства [101].

В отдельную группу внутри семейства C/EBP выделяют так называемые «PAR-белки», не содержащие лейциновой застёжки и не способные к димеризации. Один из белков этой группы, DBP, синтезируется только во взрослой печени [102]. Во время регенерации печени экспрессия этого гена полностью блокируется. Экспрессия DBP подчинена циркадному ритму, который контролируется на транскрипционном уровне [103].

Так как значительные количества белков семейства C/EBP выявляются только в неделящихся дифференцированных клетках, а в клетках регенерирующей печени, первичных культурах гепатоцитов и гепатомах их уровень очень невысок, было выдвинуто предположение об антипролиферативном действии этих факторов [104]. Оказалось, что последовательная экспрессия нескольких факторов семейства C/EBP является необходимым условием для терминальной дифференцировки культуры преадипоцитов при гормональном воздействии [105]. Гиперэкспрессия C/EBP $\alpha$  вызывает преждевременное прекращение клеточного деления [104].

Мыши с инактивированным геном C/EBP $\alpha$  умирают через несколько часов после рождения от нарушения системы синтеза и хранения гликогена [106]. Первичные культуры гепатоцитов, полученные от таких мышей, характеризуются значительным ускорением пролиферации и увеличением частоты трансформации по сравнению с культурами нормальных гепатоцитов новорожденных мышей [107]. В таких культурах сохраняются эпителиальный фенотип и экспрессия CA.

Таким образом, C/EBP $\alpha$ , вероятно, является важным переключателем процессов, связанных с поддержанием дифференцировки, контролем пролиферации и поддержанием нетрансформированного фенотипа. Кроме того, есть указания на участие белков семейства C/EBP в процессе дифференцировки стволовых кроветворных клеток, происходящем в эмбриональной печени [108].

**Семейство HNF3.** Члены семейства HNF3 содержат ДНК-связывающий домен типа «крылатая спираль», гомологичный соответствующему району белка *fork head* дрозофилы и состоящий из участка спираль-поворот-спираль и двух «крыльев», участвующих во взаимодействии с ДНК [109, 110]. По третичной структуре ДНК-связывающий домен HNF3 имеет большое структурное сходство с неродственным ДНК-пакующим гистоном H5. Это позволяет предположить, что факторы HNF3 участвуют в изменении нуклеосомной организации хроматина при активации транскрипции генов [94].

Члены семейства – белки HNF3 $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [111, 112] – узнают одинаковые последовательности ДНК, взаимодействуя с ними в виде мономеров [110]. Эти факторы активируют транскрипцию ряда генов, специфичных для печени, например CA [113], HNF1 [80], а также HNF3 $\alpha$  и HNF3 $\beta$  [114], образуя, таким образом, авторегуляторную петлю.

HNF3 $\beta$  впервые выявляется в мышинном эмбрионе на седьмой день развития в первичной полоске и первичном узелке [115]. HNF3 $\alpha$  повторяет динамику HNF3 $\beta$ , но на более низком концентрационном уровне. HNF3 $\gamma$  начинает экспрессироваться на двенадцатый день развития [116].

Во взрослом организме HNF3 $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  локализуются в печени, кишечнике, легких и желудке, кроме того, HNF3 $\beta$  и  $\gamma$  – в яичниках, и HNF3 $\gamma$  – в семенниках [101]. Повышение уровня HNF3 $\alpha$  наблюдается в первичных культурах гепатоцитов, культивируемых на внеклеточном матриксе. По-видимому, HNF3 $\alpha$  участвует в передаче внеклеточных сигналов, определяющих дифференцировку гепатоцитов [83, 117].

Инактивация гена HNF3 $\beta$  приводит к гибели мышинных эмбрионов на десяти-одиннадцатые сутки развития за счет нарушения процесса образования кишечной трубки [118, 119]. Инактивация гена HNF3 $\beta$  в печени с использованием рекомбиназы Cre под контролем регуляторных элементов гена CA не влияет на уровни экспрессии других ГЯФ – HNF1, HNF4 $\alpha$ , HNF3 $\alpha$  и  $\gamma$  [120]. Делеция HNF3 $\alpha$  существенно снижает скорость роста мышей после рождения и вызывает смерть, связанную с нарушением гомеостаза глюкозы за счет падения экспрессии проглюкагона в поджелудочной железе, в первую неделю жизни [121]. Мыши, у которых поврежден HNF3 $\gamma$ , не имеют видимых нарушений в развитии и отличаются от нормальных животных повышением экспрессии HNF3 $\alpha$ ,  $\beta$  и снижением уровня транскрипции некоторых гепатоспецифических генов [122].

**Семейство HNF4.** К настоящему времени идентифицировано несколько представителей

семейства HNF4 [123, 124], из которых наиболее полно охарактеризован HNF4 $\alpha$ . Гомологичный ген, экспрессирующийся в тканях, соответствующих HNF4-экспрессирующим органам млекопитающих, описан у дрозофилы [125]. У *Xenopus laevis* гомолог HNF4 является, по-видимому, предсуществующим материнским компонентом, градиентно распределенным в яйце [126].

По своей структуре факторы HNF4 относятся к суперсемейству ядерных рецепторов. Как и другие белки этого типа, они содержат два ДНК-связывающих домена типа «цинковые пальцы» и обширный С-концевой район, обеспечивающий димеризацию и связывание лиганда. Лиганд, способный достоверно активировать HNF4 $\alpha$  *in vivo*, пока не идентифицирован.

Как и большинство ядерных рецепторов, HNF4 $\alpha$ , чтобы связаться с ДНК, должен образовать гомодимер [123]. Другие ядерные рецепторы не димеризуются с HNF4 $\alpha$ , однако могут участвовать в регуляции контролируемых им генов, конкурируя за общие сайты связывания. Ядерные рецепторы COUP-TF1 и COUP-TF2 – кофакторы HNF4, усиливают его действие, оптимальным образом ориентируя его активационный домен [127].

Среди нетканеспецифических транскрипционных факторов описан еще целый ряд возможных ко-активаторов HNF4 $\alpha$  [128, 129]. Множественные формы HNF4 $\alpha$ , образуемые благодаря альтернативному сплайсингу, характеризуются разной способностью взаимодействовать с ко-активаторами, моделирующей их трансакционные свойства [130].

HNF4 $\alpha$  способен активировать экспрессию ряда гепатоспецифических генов и, кроме того, является основным регулятором экспрессии гена HNF1 [179, 80].

HNF4 $\alpha$  – один из самых ранних маркеров первичной энтодермы. В мышинном эмбрионе мРНК HNF4 $\alpha$  впервые выявляется на пятый день развития в слое клеток, выстилающих blastocell. До девятого дня экспрессия HNF4 $\alpha$  ограничивается висцеральной внеэмбриональной энтодермой, затем мРНК HNF4 $\alpha$  появляется в зачатке печени и кишки [131].

Во взрослом организме HNF4 $\alpha$  экспрессируется в печени, почках, кишечнике и поджелудочной железе [101, 123, 132].

В дедифференцированных гепатомных клеточных линиях и в межклеточных гибридах утата гепатоцитарного фенотипа обычно сопровождается падением экспрессии HNF4 $\alpha$  [87, 133]. Аналогичная закономерность была обнаружена *in vivo* при сравнительной характеристике перевиваемых мышинных гепатом с различным уровнем дифференцировки (Лазаревич и др., го-



товится к печати). Экспрессия экзогенного HNF4 $\alpha$  в дедифференцированной гепатоме H5 ведет не только к рекспрессии ряда генов, специфических для печени, но также к частичному восстановлению эпителиальной морфологии и приобретению клетками способности реагировать на дифференцировочные стимулы [134, 135].

Инактивация гена HNF4 $\alpha$  приводит к смерти гомозиготных мышинных эмбрионов на одиннадцатый день развития [136] за счет аномальной гастрულიции, связанной с нарушением развития висцеральной энтодермы [137].

Важно отметить, что сходный фенотип описан у мышей с инактивированным геном GATA6 [138]. Транскрипционные факторы семейства GATA играют важную роль в регуляции клеточной дифференцировки и эмбрионального морфогенеза. В эмбриональных телах, полученных из эмбриональных стволовых клеток с инактивированным геном GATA6, подавлена экспрессия энтодермальных маркеров HNF4 $\alpha$ , HNF1, HNF3 $\beta$ , GATA4 и АФП. Экспрессия экзогенного GATA6 в незэнтодермальных клетках активирует промотор HNF4 $\alpha$ .

Экспрессия HNF4 $\alpha$  и других маркеров висцеральной энтодермы может также индуцироваться факторами суперсемейства TGF $\beta$  [139, 140].

Семейство HNF6. С сайтом связывания HNF3 в промоторах некоторых гепатоспецифических генов может связываться еще один фактор, HNF6, принадлежащий, к новому семейству гепатоцитарных ядерных факторов [141, 142]. Этот фактор стал первым охарактеризованным представителем нового класса гомеобелков, получившего название ONECUT.

HNF6 впервые выявляется на девятый день развития мышинного эмбриона [143]. Во взрослом организме он экспрессируется в печени, поджелудочной железе, селезенке, мозге и семенниках. Вероятно, на некоторых стадиях развития HNF6 участвует в регуляции экспрессии генов HNF4 $\alpha$  и HNF3 $\beta$ . Экспрессия гена HNF6 во взрослой печени зависит от пола и может быть индуцирована гормоном роста [144].

Регуляционная иерархия ГЯФ. Между ГЯФ существует регуляционная иерархия. Наиболее полно изучена взаимосвязь между экспрессией HNF1 и HNF4 $\alpha$ . Это подтверждают опыты на мышах с делецией локуса *hsdr-1* на хромосоме 7 (*C<sup>14CoS</sup>* – albino deletion mice). У животных с такой делецией значительно подавлена экспрессия многих генов, специфических для печени, они умирают вскоре после рождения. Скорость транскрипции генов HNF1 и HNF4 $\alpha$  у таких мышей составляет соответственно 20 и 10% нормы, скорость транскрипции C/EBP снижена в 2 раза. Транскрипция остальных ГЯФ изменяется не-

значительно, что указывает на то, что их экспрессия регулируется независимо [145].

В промоторе гена HNF1 выявлены сайты связывания HNF4, HNF3 и AP-1 [79]. Мутации в сайте связывания HNF4 приводят к падению уровня экспрессии HNF1 на 95%, а повреждение сайтов HNF3 – на 33%. В дедифференцированных гепатомных клеточных линиях и межклеточных гибридах утрата гепатоцитарного фенотипа обычно сопровождается падением синтеза HNF4 $\alpha$  и HNF1, а трансфекция экспрессирующего вектора HNF4 $\alpha$  восстанавливает экспрессию генов, специфических для печени, и HNF1 [80, 87, 134, 135]. Экспрессия гена HNF1 в таких клетках не связана с экспрессией факторов семейства HNF3. В некоторых линиях клеток индукция транскрипционной активности AP-1 в несколько раз повышает активационный эффект HNF4 $\alpha$  [80].

Описан авторегуляционный механизм, по которому HNF1 может снижать скорость транскрипции собственного гена [146]. Поскольку показано, что HNF1 непосредственно не связывается со своим промотором, в этом случае негативная регуляция осуществляется по непрямому механизму. Скорее всего HNF1 блокирует активационный эффект HNF4 $\alpha$ , но на каком уровне, пока неясно.

Позитивный авторегуляторный механизм экспрессии описан для генов C/EBP [98] и HNF3 [114].

Есть данные, что в некоторых гепатомных линиях трансфекция экспрессирующего вектора HNF1 может возобновлять транскрипцию HNF4 $\alpha$ , подавленную ранее [87]. Действительно, в промоторном районе гена HNF4 $\alpha$  обнаружен сайт связывания HNF1, а экспрессия HNF1, повышает уровень экспрессии репортерного гена, контролируемого промотором HNF4 $\alpha$  [147]. Однако это наблюдение справедливо не для всех клеточных линий [80] и совершенно не подтверждается в опытах на трансгенных мышах [147]. При инактивации гена HNF1 *in vivo* уровень экспрессии HNF4 $\alpha$  снижается несущественно [88]. Все эти данные, а также динамика появления ГЯФ в онтогенезе указывают на то, что если HNF1 и участвует в регуляции экспрессии гена HNF4 $\alpha$  *in vivo*, то лишь на поздних стадиях развития, при установлении уровня его экспрессии во взрослом организме.

Некоторые закономерности регуляции ГЯФ в процессе развития были исследованы при анализе спектров экспрессии в эмбриональных телах, полученных из эмбриональных стволовых клеток с инактивированными генами HNF3 $\alpha$  или HNF3 $\beta$  [148]. На этой системе были показаны участие HNF3 $\beta$  в поддержании уровней экспрессии HNF4 $\alpha$  и HNF1 и его необходимость для экспрессии гена HNF3 $\alpha$ .

Инактивация гена HNF3 $\alpha$  в эмбрионидных телах не затрагивает уровни экспрессии vHNF1, HNF3 $\beta$  и  $\gamma$ , зато приводит к усилению экспрессии генов HNF4 $\alpha$  и HNF1.

Таким образом, было показано, что в процессе развития HNF3 $\beta$  является сильным активатором экспрессии HNF4 $\alpha$  и HNF1, в то время как HNF3 $\alpha$ , обладая существенно более слабыми трансаактивационными свойствами, за счет конкуренции с HNF3 $\beta$  за сайты связывания действует как негативный регулятор транскрипции. Соотношение HNF3 $\beta$ /HNF3 $\alpha$  в клетке может увеличиваться при добавлении инсулина [148].

Имеющиеся к настоящему времени данные по взаимосвязи различных групп ГЯФ суммированы на рис. 2.

К сожалению, очень мало пока известно о взаимодействии каскада ГЯФ с нетканеспецифическими регуляторными путями, обеспечивающими контроль клеточной пролиферации и дифференцировки. Представляется, что ключевую роль в интеграции общих и тканеспецифических путей передачи сигнала мог бы играть HNF4, который не только контролирует печень-специфическую экспрессию генов, но и определяет эпителиальный морфогенез, возможно, через активацию E-кадгерина [135].

Таким образом, к настоящему времени описано несколько семейств ГЯФ, в той или иной мере контролирующих экспрессию большинства известных генов, специфичных для печени. Эти семейства принадлежат к большим, ранее описанным суперсемействам транскрипционных факторов, и сохраняют высокую консервативность у разных видов. Внутри одного семейства факторы узнают одну и ту же последовательность ДНК и часто способны образовывать гетеродимеры, модулирующие их индивидуальные свойства. Кроме того, в клетке может экспрессироваться несколько форм одного и того же белка с различными трансаактивационными свойствами. Так как эти формы конкурируют за сайт связывания на регулируемом гене, то от того, какая форма будет успешнее связываться, зависит эффективность активации транскрипции.

Факторы, относящиеся к различным семействам, также модифицируют действие друг друга, действуя синергично, либо конкурируя за перекрывающиеся сайты связывания.

Судя по всему, в настоящее время выявлена существенная часть транскрипционных факторов, определяющих экспрессию генов, специфичных для печени. Почти все они охарактеризованы как активаторы транскрипции, что, од-

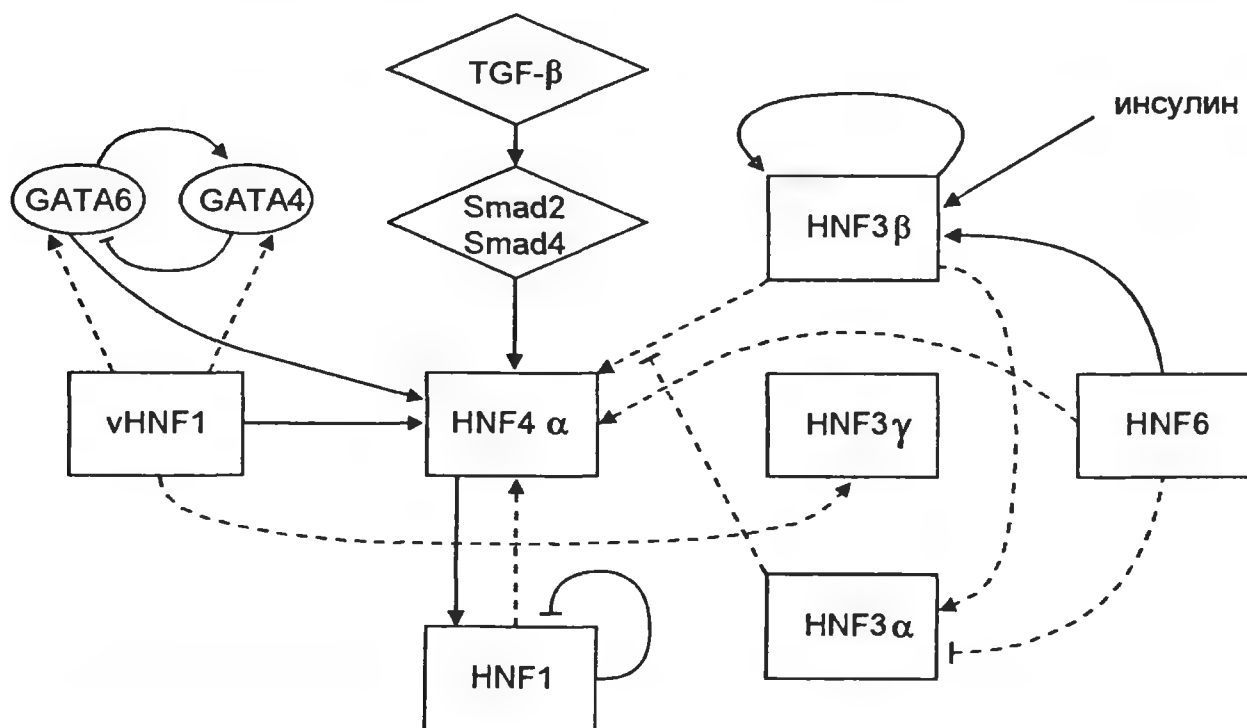


Рис. 2. Транскрипционная иерархия гепатоцитарных ядерных факторов. Сплошными линиями обозначены взаимосвязи, имеющие наиболее универсальный характер, пунктирными – закономерности, выявляющиеся на определенных этапах развития

нако, не исключает возможности существования негативных механизмов регуляции. Такая негативная регуляция может осуществляться как за счет действия репрессорных факторов и форм с пониженной транскрипционной активностью, так и за счет конкуренции между белками за общий или перекрывающийся сайт связывания или за счет изменений на уровне конформации хроматина, затрудняющих связывание белка-активатора с узнаваемой им последовательностью.

Число генов, регулируемых ГЯФ, существенно превышает число самих факторов. Решающее значение для тонкой регуляции уровней экспрессии огромного количества генов печени на разных стадиях развития имеет, по-видимому, как наличие определенного набора гепатоцитарных и универсальных факторов транскрипции, так и соотношение их концентраций.

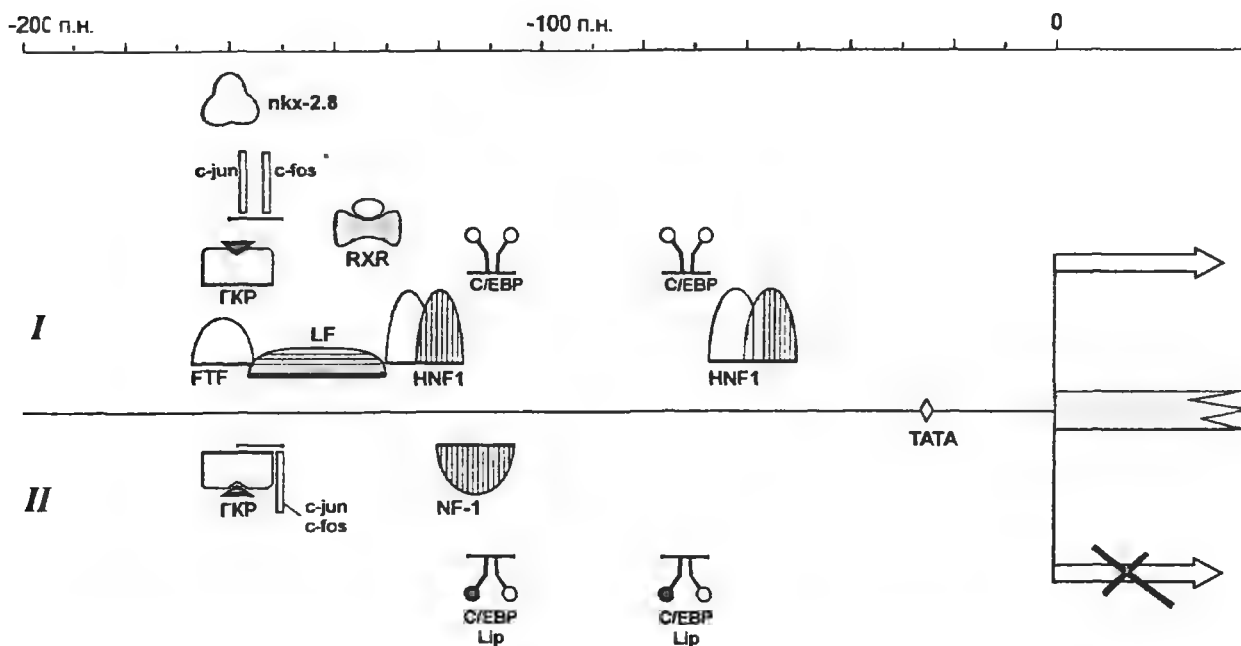
### ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АФП

**HNF1.** В промоторе АФП выявлены два сайта связывания HNF1: -64/-49 и -131/-117 п.н. [96]

(рис. 3). Дистальный сайт связывает HNF1 только в клетках гепатоцитарного происхождения, причем более эффективно, чем проксимальный [67, 149]. Делеция этого сайта блокирует транскрипцию гена АФП [47].

Сайты связывания факторов семейства HNF1 обнаружены и в промоторах генов СА (-65/-53 п.н.) [69],  $\alpha$ -альбумина (-171/-159 и -101/-89 п.н.) [9] и групп-специфического компонента [55], что подтверждает предположение о том, что эта группа факторов участвует в координированной регуляции экспрессии кластерно расположенных генов печени. Расположение сайтов связывания HNF1 в промоторных областях АФП и СА высококонсервативно у мышей, крыс и человека [9, 150].

HNF1 и vHNF1 способны активировать экспрессию гена АФП в клетках печени как *in vitro*, так и *in vivo* [149]. В клетках гепатоцитарного происхождения vHNF1, раньше появляющийся в эмбриогенезе, более эффективно, чем HNF1, стимулирует промотор АФП, но не СА. В свою очередь HNF1 оказывает значительный стимулирующий эффект на промоторы других альбуминовых генов, например гена групп-специфического компонента в клетках человеческой гепатомы HepG2. vHNF1 выступает в этом случае



**Рис. 3.** Возможная модель регуляции активности промотора гена АФП. ТАТА – ТАТА-бокс. *I* – Активация промотора. Факторы, расположенные выше линии, обозначающей промоторный район гена АФП, инициируют транскрипцию. AP-1 может активировать промотор в отсутствие ГКР и наоборот. *II* – Супрессия промотора. Факторы, расположенные ниже линии, обозначающей промотор гена АФП, подавляют экспрессию. В случае одновременного присутствия комплекса AP-1 и ГКР происходит их конкуренция на уровне белок-белкового взаимодействия или за связывание с ДНК. Некоторые гетеродимеры C/EBP и «усеченная» форма C/EBP-LIP на разных этапах развития могут супрессировать промотор

в качестве трансдоминантного ингибитора [55]. Эти данные указывают на то, что баланс уровней HNF1/ $\nu$ HNF1 может существенно влиять на соотношение количества АФП и продуктов других альбуминовых генов (по крайней мере, на некоторых системах). В клетках негепатоцитарного происхождения трансфекция векторов, экспрессирующих HNF1 и  $\nu$ HNF1, индуцирует резкий рост экспрессии генов АФП и СА, причем в этом случае активационный эффект HNF1 выше [151].

**ATBF1.** В энхансере гена АФП человека описана последовательность, напоминающая сайт связывания HNF1, однако эффективность связывания HNF1 в этом районе значительно ниже, чем в промоторных элементах [149]. С этим районом связывается еще один транскрипционный фактор – ATBF1 [152]. Сайты связывания HNF1 в промоторах АФП и СА также способны связывать ATBF1, но значительно менее эффективно. ATBF1 экспрессируется как в гепатомах, так и в культурах клеток негепатоцитарного происхождения [152]. В клетках гепатомы человека ATBF1 подавляет транскрипционную активность энхансера и промотора АФП, но не СА, по-видимому, за счет конкуренции с HNF1 за общий сайт связывания [153].

**С/ЕВР.** В промоторной области гена АФП выявлены два сайта связывания факторов семейства С/ЕВР: –77/–68 и –115/–106 п.н. (рис. 3). Еще несколько сайтов связывания белков этого семейства обнаружено в энхансерном элементе Е1 [96]. Дистальный промоторный сайт эффективнее связывает белки семейства С/ЕВР, чем проксимальный, а аффинность связывания этих факторов с энхансерными сайтами выше, чем с промоторными [96, 151].

В регуляции экспрессии гена АФП могут участвовать по крайней мере четыре активатора транскрипции, относящиеся к семейству С/ЕВР – С/ЕВР $\alpha$ , С/ЕВР $\beta$ , С/ЕВР $\gamma$ , DBP, и негативный регулятор LIP [96, 151]. Хотя С/ЕВР $\alpha$  и С/ЕВР $\beta$  способны активировать промотор АФП *in vitro*, корреляций между активностью промотора АФП в ходе развития и действием белков этого семейства не обнаружено. После рождения, в то время как синтез АФП резко падает, концентрации С/ЕВР $\alpha$  и С/ЕВР $\beta$  значительно увеличиваются, а соотношение LIP/С/ЕВР $\beta$  снижается. В отличие от промоторных, сайты С/ЕВР, расположенные в энхансере, во время позднего эмбриогенеза и после рождения активируются С/ЕВР $\alpha$ . Этот энхансер остается активным во взрослой печени и, возможно, влияет на промотор СА [151].

**NF-1.** В промоторе гена АФП локализован сайт связывания нетканеспецифического факто-

ра NF-1 –123/–108 п.н., частично перекрывающийся с сайтами HNF1 и С/ЕВР [47, 96] (рис. 3). В низких концентрациях NF-1 слабо стимулирует промотор АФП, в высоких подавляет его активность, в то время как промотор СА активируется NF-1 пропорционально концентрации последнего [151].

**FTF.** Промоторная последовательность –166/–155 п.н., представляющая собой канонический мотив для связывания ядерных рецепторов, принадлежащих к семейству *Drosophila fushi tarazu* (Ftz-F1), необходима для связывания недавно идентифицированного представителя этого семейства – белка FTF [154] (рис. 3).

Изоформы FTF, обладающие сходной транскрипционной активностью, связываются с ДНК в виде мономеров и не нуждаются в лиганде. FTF специфичен для печени новорожденных и взрослых крыс, несколько меньше его в эмбриональной печени и в поджелудочной железе. Кроме того, он выявляется в некоторых АФП-синтезирующих гепатомах [154, 155].

По-видимому, FTF связывается с промотором кооперативно с еще одним фактором – LF, сайт посадки которого частично перекрывается с сайтом FTF: –155/–134 п.н. [154]. Сайты связывания FTF выявлены в промоторах других генов, специфичных для печени, в том числе в промоторе HNF3 $\beta$  [155].

**NKX-2.8.** Последовательность –166/–153 п.н., консервативная у мышей, крыс и человека [156], необходима для стимуляции активности промотора АФП далеко удаленными от него энхансерами (рис. 3). Делеция этого участка ведет к падению уровня экспрессии репортерного гена на 70% [157], в то время как при уменьшении расстояний между промотором и энхансерами или при отсутствии энхансеров такая делеция не влияет на уровень экспрессии гена [158].

При скрининге экспрессирующей библиотеки из человеческой гепатомы был клонирован новый фактор, *nkx-2.8*, связывающийся с указанным сайтом [159]. Видимо, *nkx-2.8* обеспечивает контакт промотора гена АФП с одним или несколькими энхансерами, взаимодействуя с ассоциированными с ними комплексами регуляторных белков.

*nkx-2.8* экспрессируется только в эмбриональной печени и гепатомных линиях, экспрессирующих АФП [157]. Так как экспрессия *nkx-2.8* четко ассоциирована с экспрессией АФП, предполагается, что он может играть важную роль в поддержании высокого уровня экспрессии АФП в эмбриональной печени, а его отсутствие во взрослой печени может быть причиной молчания гена [157]. Возможно также, что причиной падения экспрессии гена АФП может

быть конкуренция *nkx-2.8* с другими транскрипционными факторами за перекрывающиеся сайты связывания.

Промотор СА не имеет сайта связывания *nkx-2.8* и, вероятно, взаимодействует с энхансерами АФП через другие *транс*-факторы и *цис*-элементы, не конкурируя за взаимодействие с одними и теми же последовательностями в энхансерах АФП [58, 157].

**Элементы чувствительности к ядерным рецепторам.** В модуляции экспрессии гена АФП на различных стадиях развития могут принимать участие некоторые ядерные рецепторы, прежде всего глюкокортикоидные рецепторы и рецепторы ретиноевой кислоты. На разных стадиях онтогенеза и канцерогенеза один и тот же гормон-рецепторный комплекс может выступать и как активатор, и как репрессор экспрессии одного и того же гена.

**Глюкокортикоидные гормоны.** Сразу после рождения глюкокортикоиды и их синтетический аналог (дексаметазон) существенно ускоряют падение экспрессии гена АФП в печени грызунов. Гормональная регуляция, не влияющая на уровни синтеза СА в печени и АФП почках [25, 160], является в этом случае ткане- и стадийноспецифичной. Дeksаметазон подавляет экспрессию гена АФП в крысиной гепатоме McA-RH 7777 и индуцирует ее в клетках гепатомы McA-RH 8994, характеризующейся относительно низким уровнем синтеза АФП [161].

В регуляторном районе гена АФП описано несколько последовательностей, узнаваемых глюкокортикоидным гормон-рецепторным комплексом (ГКР) [47]. Две из них находятся в промоторном районе: -166/-154 и -224/-219 п.н. [47, 96] (рис. 3), именно они определяют чувствительность к дексаметазону в клетках McA-RH 7777 [162]. Промоторные сайты связывания ГКР частично перекрываются с сайтами связывания других транскрипционных факторов – *nkx-2.8*, FTF, LF, AP-1 [154, 158], которые могут конкурировать с ГКР за сайт связывания.

**Ретиноевая кислота.** Ретиноевая кислота регулирует экспрессию гена АФП в клетках эмбриональной карциномы и гепатом. Она индуцирует дифференцировку клеток мышинной тератокарциномы F9 в висцеральную энтодерму, сопровождаящуюся активацией экспрессии генов АФП и *vHNF1* [82, 163]. В клетках крысиных гепатом McA-RH 7777 и McA-RH 8994 ретиноевая кислота активирует экспрессию гена АФП на транскрипционном уровне [164–166], причем в клетках McA-RH 8994 показана одновременная индукция гена СА. В то же время ретиноевая кислота вызывает падение уровней экспрессии генов АФП и СА в некоторых гепатомах че-

ловека [167] и гена СА в первичной культуре крысиных гепатоцитов [168].

Влияние ретиноевой кислоты на экспрессию гена АФП может осуществляться как опосредованно, через индукцию ГЯФ (см. выше), так и за счет связывания гормон-рецепторных комплексов с соответствующими сайтами в регуляторных элементах АФП. В регуляторном районе гена АФП выявлены три элемента, определяющие чувствительность к ретиноевой кислоте. Один из них расположен в промоторе (-139/-127 п.н.) и перекрывается с сайтами связывания других транскрипционных факторов [165]. Экспрессия ядерного рецептора COUP-TF1, способного связываться с той же промоторной последовательностью, блокирует активацию промотора АФП ретиноевой кислотой.

Многообразие механизмов регуляции экспрессии гена АФП при воздействии глюкокортикоидных гормонов и ретиноевой кислоты может определяться как наличием в клетке нескольких форм соответствующих рецепторов с разными трансактивационными свойствами, так и конкуренцией за перекрывающиеся сайты связывания либо белок-белковыми взаимодействиями с другими транскрипционными факторами.

Подробнее механизмы регуляции экспрессии гена АФП глюкокортикоидными и ретиноидными рецепторами обсуждаются в обзоре [169].

**Влияние онкобелков на экспрессию гена АФП.** В промоторе гена АФП локализован сайт связывания транскрипционного комплекса AP-1 (-160/-152 п.н.) (рис. 3). Этот сайт связывает продукты онкогенов семейств *jun* и *fos* [162] в виде гетеродимеров Jun-Fos или гомодимеров Jun-Jun, причем в последнем случае эффективность связывания и активационный эффект существенно снижены [170].

Протоонкогены, принимающие участие в процессах клеточной дифференцировки и пролиферации, экспрессируются в печени на определенных стадиях эмбрионального развития. После рождения их синтез существенно падает. *In vivo* при пролиферации гепатоцитов во взрослой регенерирующей печени уровень экспрессии онкогенов *c-jun*, *c-fos* и *c-myc* существенно возрастает, высокие уровни экспрессии наблюдаются также в некоторых гепатомных клеточных линиях [171]. Кинетика активации ядерных онкогенов в культурах нормальных гепатоцитов при индукции EGF коррелирует с активацией экспрессии гена АФП, причем мРНК АФП появляется на несколько часов позже, чем мРНК онкогенов. На основании этих наблюдений была выдвинута гипотеза о возможном участии онкобелков в регуляции экспрессии гена АФП [171, 172]. Так как в некоторых гепатомных кле-



точных линиях с высоким уровнем синтеза АФП и в непродуцирующих АФП культурах уровни экспрессии ядерных онкогенов не различаются, предполагается, что по крайней мере в трансформированных гепатоцитах ядерные онкогены не оказывают прямого активационного действия на экспрессию гена АФП [171].

В промоторе АФП сайт AP-1 частично перекрывается с сайтом посадки ГКР (рис. 3). Кроме того, на различных клеточных линиях продемонстрирован функциональный антагонизм между AP-1 и ГКР.

В клетках почки обезьяны CV-1 и мышинной тератокарциномы F9 промотор АФП может быть активирован трансфекцией онкогенов *c-jun* и *c-fos* либо глюкокортикоидного рецептора в отсутствие *c-jun/c-fos* продуктов. Совместная экспрессия ядерных онкогенов и глюкокортикоидного рецептора приводит к подавлению экспрессии гена АФП [162]. В клетках человеческой гепатомы NuH-7 трансфекция онкогенов *c-jun* и *c-fos* подавляет активность промотора АФП и снижает активационный эффект, наблюдавшийся при обработке нетрансфицированных клеток дексаметазоном [170].

Функциональный антагонизм между AP-1 и ГКР может осуществляться, вероятно, либо за счет частичного перекрытия соответствующих сайтов связывания в промоторном районе АФП, либо за счет белок-белковых взаимодействий [162, 170]. Функциональный антагонизм между AP-1 и ГКР участвует в регуляции экспрессии и некоторых других генов [169]. Реципрокное подавление транскрипционной активности описано также для ядерных протоонкогенов и рецепторов ретиноевой кислоты [173].

Комплекс AP-1 не влияет на активность промотора и энхансера гена СА [170], что допускает возможный вклад этих факторов в дифференциальную регуляцию экспрессии генов АФП и СА на эмбриональном и постнатальном этапах онтогенеза.

**p53.** Недавно был предложен механизм p53-зависимой репрессии гена АФП за счет возможной конкуренции этого белка с активационным фактором HNF3 за перекрывающиеся сайты связывания, расположенные в репрессорном районе гена АФП [174]. Предлагаемый механизм, возможно, участвует в регуляции экспрессии гена АФП на некоторых стадиях развития, однако он, по-видимому, не носит универсального характера, так как в первичной культуре мышинных гепатоцитов индукция экспрессии гена АФП происходит независимо от активности p53, а в клонах крысиной гепатомы, различающихся по уровню экспрессии АФП (см. ниже), не наблюдается корреляции этого признака с

активностью p53 (Кудрявцева и Лазаревич, неопубликованные данные).

**Участие факторов *Afr1* и *Afr2* в регуляции экспрессии гена АФП.** При сравнении линий мышей, различающихся уровнями экспрессии гена АФП во взрослой печени в норме или при регенерации, были выявлены два независимых *транс*-действующих генетических локуса – *Afr1* и *Afr2* [40, 41]. *Afr1* контролирует (по крайней мере частично) низкий уровень экспрессии гена АФП во взрослой печени, а *Afr2* определяет уровень индукции экспрессии при регенерации [41]. Действие обоих генов плейотропно и влияет на экспрессию еще по меньшей мере одного печеночного гена – *H19* [175].

Ген *Afr1* картирован на хромосоме 15, на расстоянии 2–3 сантиморган от гена *c-myc* [176]. Выявлены два аллеля: доминантный *Afr1<sup>a</sup>* и рецессивный *Afr1<sup>b</sup>*, обеспечивающий 15–20-кратное повышение уровня экспрессии гена АФП во взрослой печени [40, 41]. Действие *Afr1*-локуса на гены АФП и *H19* специфично для печени и не связано с их репрессией в кишечнике [175, 177]. Экспрессия гена СА не зависит от *Afr1*-фенотипа [42].

Для гена *Afr2*, картированного на хромосоме 11 человека [178], доминирующим является аллель *Afr2<sup>b</sup>*, определяющий в 10 раз более слабую индукцию экспрессии при регенерации во взрослой печени, чем аллель *Afr2<sup>a</sup>*, выявленный в большинстве линий мышей [41].

Мишенями для факторов *Afr1* и *Afr2* являются *цис*-элементы, расположенные в репрессорном районе, который определяет падение уровня мРНК АФП в первые недели жизни мышей [42, 179, 180].

Некоторые данные указывают на то, что продукт гена *Afr1* может участвовать в посттранскрипционной регуляции, взаимодействуя с нетранслируемыми 5'- и 3'-районами структурного гена АФП, контролирующими стабильность мРНК [42]. Однако данные о том, что экспрессия мышинного гена *H-2<sup>D</sup>* главного комплекса гистосовместимости I класса под контролем первого энхансера, промотора и репрессора гена АФП в соответствующих тканях подавляется после рождения и активируется при регенерации параллельно с эндогенным геном АФП указывают на то, что регуляция осуществляется не через последовательности структурного гена [179].

По-видимому, *Afr1* действует как фактор негативной регуляции сразу после рождения. Продукт гена *Afr1* связывается с ДНК в районе репрессора и, вероятно, взаимодействует прямо или косвенно с одним из основных факторов транскрипции, компонентом преинициаторного комплекса РНК-полимеразы II. Возможно, это

взаимодействие модифицирует некоторые активности РНК-полимеразы II. Так как скорость транскрипции генов АФП и *H19* в трансгенных мышах не зависит от *Afr1*-фенотипа, вероятно, репрессия транскрипции происходит не на стадии инициации, а, например, при элонгации или формировании 3'-конца РНК [42]. Это может изменять стабильность транскрипта АФП. Особый интерес в этой схеме вызывает основной фактор транскрипции, который может оказаться связующим звеном между транскрипционным и посттранскрипционным уровнями регуляции [179].

Представленный механизм не противоречит утверждению о посттранскрипционной регуляции экспрессии АФП *Afr1*, а, наоборот, дополняет его. Вероятно, в этом случае нет строгой границы между посттранскрипционным и транскрипционным уровнями регуляции и, видимо, есть неохарактеризованные пока факторы, которые объединяют их в единый механизм.

Во время регенерации печени уровень экспрессии гена АФП возрастает, что, возможно, связано с действием позитивного регулятора *Afr2*. Цис-элементы, необходимые для такой регуляции, расположены в области -1010/-838 п.н. [180].

Таким образом, белки, кодируемые *Afr2* и *Afr1*, связываются с разными последовательностями и действуют независимо [180]. Ведущая в настоящее время работа по клонированию *Afr1* и *Afr2* позволит существенно расширить представления о механизмах репрессии гена АФП во взрослой печени.

В пользу существования дополнительных механизмов негативной регуляции гена АФП говорит серия результатов, полученных за последние годы в лаборатории автора. Моделью для изучения механизмов регуляции экспрессии гена АФП послужила коллекция клонов крысиной гепатомы McA-RH 7777, различающихся по уровню синтеза АФП, полученная в лаборатории иммунохимии Института канцерогенеза ОНЦ РАМН Т.Л. Эрайзер. Уровни экспрессии гена АФП в таких клонах отличаются в ~1000 раз и контролируются на уровне транскрипции.

На этой модели нами была показана корреляция между уровнями экспрессии генов АФП, СА, HNF4 и HNF1.

При трансфекции АФП-непродуцирующих клонов вектором, экспрессирующим HNF4, во всех клетках активируется синтез HNF1 и значительно повышается количество мРНК СА. Существенного повышения синтеза АФП в клетках, трансфицированных HNF4, не происходит (Лазаревич и др., готовится к печати). Это указывает на то, что либо HNF4 необходим, но

недостаточен для активации экспрессии гена АФП в опухолевых клетках; либо HNF4 не участвует в регуляции гена АФП, но в регуляции экспрессии этих генов принимает участие общий регуляторный фактор.

Увеличение уровня HNF1 в клетке достаточно для активации экспрессии гена СА, но не АФП. Видимо, именно HNF1 определяет корреляцию уровней СА и АФП в описанной системе.

В соматических гибридах АФП-продуцирующих и АФП-непродуцирующих клонов экспрессия гена АФП полностью подавлена (рис. 4) (Кустова и Лазаревич, неопубликованные данные). В то же время, в гибридных клетках выявляется белок HNF1, не идентифицируемый в АФП-непродуцирующем клоне, т.е. падение экспрессии гена АФП не связано с падением уровня HNF1, который является одним из потенциальных регуляторов промотора АФП. Эти данные, указывают на существование в АФП-непродуцирующих клогах регуляторного фактора (факторов), блокирующего экспрессию гена АФП. Так как такой фактор еще не идентифицирован, охарактеризованная ими система может оказаться адекватной моделью для его выявления. Представляется, что только при отсутствии в клетке негативных регуляторов активность работающего промотора определяется набором других транскрипционных факторов и соотношением их форм с различными активационными свойствами.

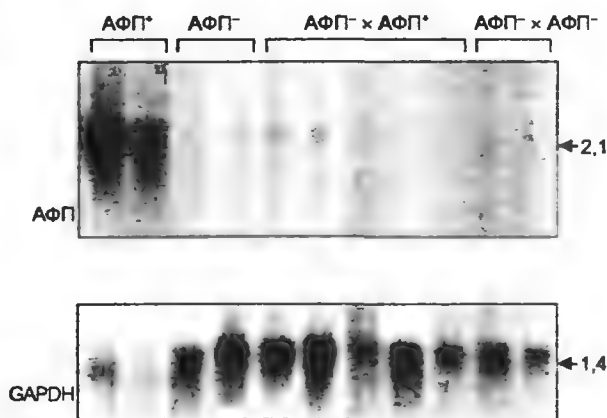


Рис. 4. Соматическая гибридизация АФП-продуцирующих (АФП<sup>+</sup>) и АФП-непродуцирующих (АФП<sup>-</sup>) клонов крысиной гепатомы. Нозерн-блот-гибридизация суммарной клеточной РНК из полученных гибридов (АФП<sup>+</sup> × АФП<sup>-</sup> и АФП<sup>-</sup> × АФП<sup>-</sup>) и исходных клонов с зондами к АФП и GAPDH. Справа указаны размеры выявляемых транскриптов в т.н.

### ВОЗМОЖНАЯ МОДЕЛЬ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНА АФП

На основании изложенных данных была предложена гипотеза [154] об активации промотора АФП комплексом транскрипционных факторов HNF1/FTF. Авторы предполагают, что FTF взаимодействует с HNF1 через фактор LF, поскольку без образования комплекса FTF/LF такого взаимодействия не происходит. Комплекс HNF1/FTF может конкурировать за сайт связывания с ГКР или NF-1.

Согласно этой концепции активность промотора АФП существенно зависит от молярного соотношения HNF1/NF-1 в ядре, которое изменяется на разных стадиях дифференцировки гепатоцитов [151, 154]. Баланс HNF1/NF-1 зависит от спектра экспрессии других специфических и общих факторов транскрипции и, возможно, служит переключателем активности промотора на разных стадиях развития [154]. Регуляция уровня экспрессии гена АФП может также происходить за счет образования димеров HNF1 с различной транскрипционной активностью и прежде всего за счет изменения соотношения факторов HNF1 и vHNF1, обладающих различной транскрипционной активностью. Возможно, это соотношение играет решающую роль в координированной регуляции кластера альбуминовых генов в процессе развития.

Значение соотношения HNF1/NF-1 и их конкуренции подтверждено *in vivo* для промотора гена АФП человека. Мутация в положении -119 п.н., затрагивающая сайт связывания NF-1, определяет наследственно высокий уровень синтеза АФП у взрослых людей [181].

В промоторном районе существует также конкуренция между транскрипционными комплексами AP-1, HNF1/FTF, ГКР и ретиноидным гормон-рецепторным комплексом. В зависимости от присутствия других транскрипционных факторов, ГКР, ретиноидного гормон-рецепторного комплекса и комплекс AP-1 могут быть как положительными, так и отрицательными регуляторами транскрипции. Более того, связывание ГКР с промотором приводит к изменению структуры хроматина, что влияет на связывание других транскрипционных факторов, например NF-1.

Белки семейства C/EBP, по-видимому, не конкурируют за сайты связывания с другими факторами, но могут модулировать промоторную активность благодаря образованию гомо- или гетеродимеров с различными транскрипционными свойствами.

Димеры C/EBP связываются с энхансером EI более интенсивно, чем с промотором АФП [96].

Этот межгенный энхансер способен активировать как промотор АФП, так и промотор СА, расположенный на расстоянии 27 т.п.н. от него и содержащий сайт связывания C/EBPα [151, 154]. Возможно, белки семейства C/EBP являются важным звеном в tandemной регуляции экспрессии СА и АФП в процессе развития, особенно если принять во внимание тот факт, что на ранних стадиях эмбриогенеза собственный энхансер СА не функционален, а межгенный энхансер очень активен. Активность EI сохраняется и во взрослой печени, когда экспрессия АФП подавлена. В некоторых типах клеток эта активность сильнее коррелирует с экспрессией СА, чем АФП [154]. Повышение уровня СА после рождения сопровождается повышением уровня C/EBP [154].

Таким образом, в настоящее время выявлено значительное количество транскрипционных факторов, способных на тех или иных системах модулировать уровни экспрессии гена АФП и других альбуминовых генов (рис. 5). Представляется, что наиболее подходящим кандидатом на роль важнейшего активатора транскрипции гена АФП мог бы быть фактор, сайты связывания которого были бы выявлены в важнейших элементах регуляторного района гена АФП; тканеспецифичность экспрессии которого максимально покрывала бы спектр экспрессии гена АФП; который бы уже экспрессировался в соответствующих тканях к моменту выявления там мРНК АФП; динамика экспрессии которого в ходе развития была бы сходна с динамикой экспрессии гена АФП; способный подавлять экспрессию других альбуминовых генов, характерных для дифференцированного состояния гепатоцитов; уровни экспрессии которого существенно увеличивались бы в ходе гепатоканцерогенеза.

Даже учитывая то, что приведенные выше критерии моделируют идеальную ситуацию, не учитывающую различия регуляторных механизмов на конкретных этапах развития, сложность и многокомпонентность этих механизмов, множественность форм некоторых регуляторных факторов, нетрудно заметить, что vHNF более, чем все охарактеризованные к настоящему времени активаторы экспрессии гена АФП, соответствует приведенным выше критериям и является, возможно, наиболее значительным позитивным регулятором гена АФП в процессе развития.

Высокоспецифичный для АФП фактор *nkx-2.8* может существенно усиливать экспрессию этого гена, обеспечивая взаимодействие промотора с удаленными от него энхансерами. Благодаря четкой корреляции уровней экспрессии *nkx-2.8* и АФП как в процессе развития, так и в опухо-

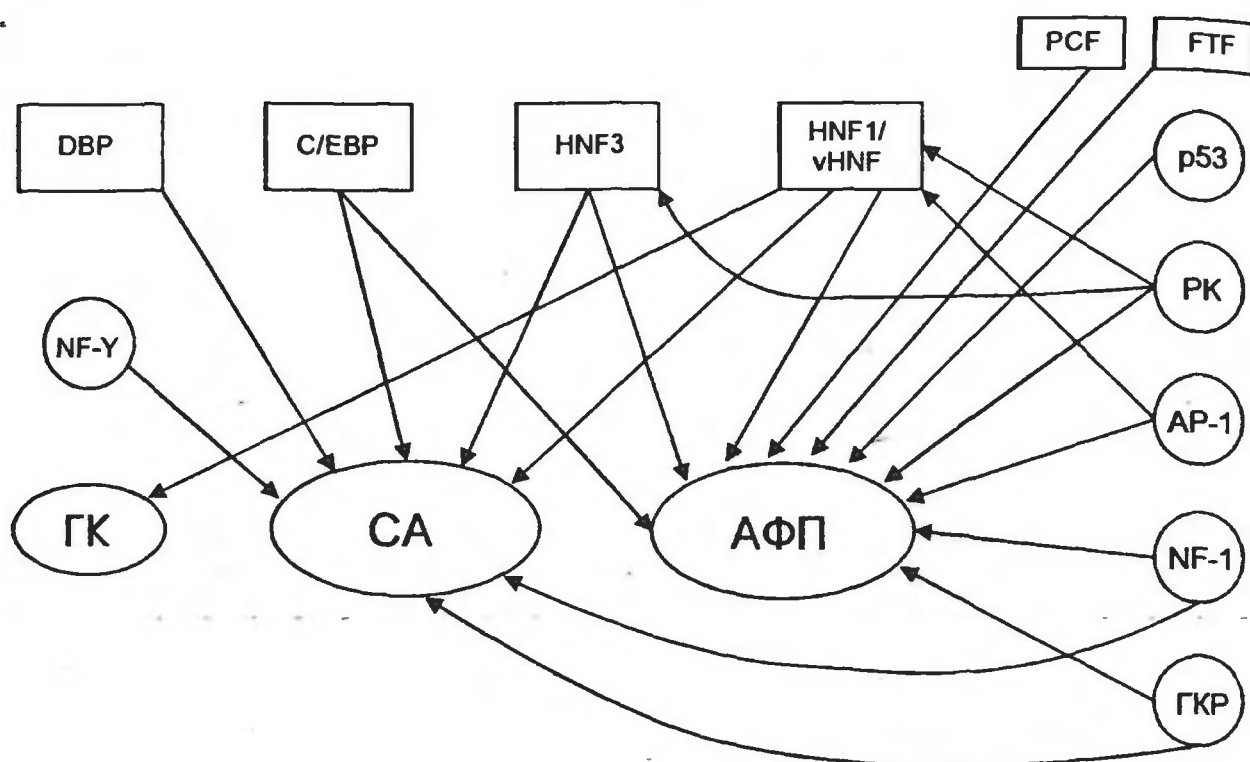


Рис. 5. Транскрипционные факторы, принимающие участие в регуляции экспрессии альбуминовых генов (PK – ретиноевая кислота, ГК – группоспецифический компонент)

левых клетках этот фактор также представляет одним из основных активаторов транскрипции АФП.

Таким образом, регуляция экспрессии гена АФП осуществляется в основном на транскрипционном уровне. В этом процессе принимает участие широкий спектр как тканеспецифических, так и общих факторов транскрипции, экспрессия которых тонко регулируется и строго зависит от стадии развития. Факторы могут конкурировать друг с другом за связывание с перекрывающимися сайтами ДНК, вступать в белок-белковые взаимодействия или образовывать комплексы при связывании с ДНК. Активационные свойства ядерных факторов внутри одного семейства могут модулироваться при образовании гомо- и гетеродимеров.

В то же время представляется, что изученные к настоящему времени механизмы не могут объяснить высокоткане- и стадийспецифическую репрессию гена АФП, которая, по нашему мнению, должна осуществляться за счет пока неидентифицированных негативных регуляторов транскрипции, поиск которых представляется одной из главных перспектив, открывающихся в этой области.

Еще одним важнейшим направлением изучения механизмов транскрипции гена АФП представляется поиск факторов, посредством которых осуществляется регуляция его экспрессии компонентами внеклеточного матрикса [183] и контролируется его зональная экспрессия *in vivo*.

Автор выражает глубокую благодарность Г.И. Абелеву и Е.В. Варга за полезные замечания и А.В. Босому за помощь в подготовке иллюстраций.

Экспериментальные данные, полученные в Институте канцерогенеза ОНЦ РАМН и использованные в этом обзоре, выполнены в рамках проектов Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 99-04-49068, 99-04-49227) и гранта поддержки ведущих научных школ (№ 96-15-98082), подпрограммы «Приоритетные направления генетики» приоритетного направления «Технологии живых систем» (грант № 99-2-024) и Федеральной целевой программы «Интеграция» (направление 1.5/99, проект №12с/99).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bergstrand, C.G., and Czar, B. (1956) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 8, 174-179.
2. Abelev, G.I., Perova, S., Khrankova, N.I., Postnikova, Z.A., and Irlin, I. (1963) *Transplant. Bull.*, 1, 174-180.
3. Татаринцов С. (1964) *Вопр. мед. химии*, 2, 584-589.
4. Abelev, G.I., Assecritova, I.V., Kraevsky, N.A., Perova, S.D., and Perevodchikova, N.I. (1967) *Int. J. Cancer*, 2, 551-558.
5. Deutsch, H.F. (1991) *Adv. Cancer Res.*, 56, 253-312.
6. Abelev, G.I. (1993) *Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol.*, 11, 85-109.
7. Cooke, N.E., and David, E.V. (1985) *J. Clin. Invest.*, 76, 2420-2424.
8. Yang, F., Brune, J.L., Naylor, S.L., Cupples, R.L., Naberhaus, K.H., and Bowman, B.H. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7994-7998.
9. Belanger, L., Roy, S., and Allard, D. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 5481-5484.
10. Guan, X.J., Arhin, G., Leung, J., and Tilghman, S.M. (1996) *Mamm. Genome*, 7, 103-106.
11. Song, Y.H., Naumova, A.K., Liebhaver, S.A., and Cooke, N.E. (1999) *Genome Res.*, 9, 581-587.
12. Kioussis, D., Eiferman, F., van de Rijn, P., Gorin, M.B., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 1960-1967.
13. Sargent, T.D., Jagodzinski, L., Yang, M., and Bonner, J. (1981) *Mol. Cell. Biol.*, 1, 871-883.
14. Dugaiczky, A., Harper, M.E., and Minghetti, P.P. (1985) *Kroc. Found. Ser.*, 19, 181-188.
15. Gorin, M.B., Cooper, D.L., Eiferman, F., van de Rijn, P., and Tilghman, S.M. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 1954-1959.
16. Gibbs, P.E., Witke, W.F., and Dugaiczky, A. (1998) *J. Mol. Evol.*, 46, 552-561.
17. Petropoulos, C.J., Yaswen, P., Panzica, M., and Fausto, N. (1985) *Cancer Res.*, 45, 5762-5768.
18. Wan, Y.J., and Chou, J.Y. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.*, 270, 267-276.
19. Lemire, J.M., and Fausto, N. (1991) *Cancer Res.*, 51, 4656-4664.
20. Watanabe, T., Jimenez-Molina, J.L., and Chou, J.Y. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185, 648-656.
21. Dziadek, M., and Adamson, E. (1978) *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 43, 289-313.
22. Tyner, A.L., Godbout, R., Compton, R.S., and Tilghman, S.M. (1990) *J. Cell. Biol.*, 110, 915-927.
23. Nahon, J.L., Tratner, I., Poliard, A., Presse, F., Poiret, M., Gal, A., Sala-Trepat, J.M., Legres, L., Feldmann, G., and Bernuau, D. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 11436-11442.
24. Cooke, N.E., McLeod, J.F., Wang, X.K., and Ray, K. (1991) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 40, 787-793.
25. Belanger, L., Frain, M., Baril, P., Gingras, M.C., Bartkowiak, J., and Sala-Trepat, J.M. (1981) *Biochemistry*, 20, 6665-6672.
26. Sala-Trepat, J.M., Dever, J., Sargent, T.D., Thomas, K., Sell, S., and Bonner, J. (1979) *Biochemistry*, 18, 2167-2178.
27. Tilghman, S.M., and Belayew, A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5254-5257.
28. Jane, S.M., Ney, P.A., Vanin, E.F., and Gumucio, D.L. (1992) *EMBO J.*, 11, 2961-2969.
29. Vergnes, L., Taniguchi, T., Omori, K., Zakin, M.M., and Ochoa, A. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, 1348, 299-310.
30. Abelev, G.I. (1978) in *Cell Differentiation and Neoplasia* (Saunders, G.G., ed.) Raven Press, NY, pp 257-269.
31. Abelev, G.I. (1971) *Adv. Cancer Res.*, 14, 295-358.
32. Abelev, G.I., and Eraiser, T.L. (1999) *Semin. Cancer Biol.*, 9, 95-107.
33. Knowles, B.B., Howe, C.C., and Aden, D.P. (1980) *Science*, 209, 497-499.
34. Schulz, W.A., Crawford, N., and Locker, J. (1988) *Exp. Cell. Res.*, 174, 433-447.
35. Latchman, D.S., Brzeski, H., Lovell-Badge, R., and Evans, M.J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 783, 130-136.
36. Deschartrette, J., Fouger-Deschartrette, C., Corcos, L., and Schimke, R.T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 765-769.
37. Nahon, J.L. (1987) *Biochimie*, 69, 445-459.
38. Andrews, G.K., Janzen, R.G., and Tamaoki, T. (1982) *Dev. Biol.*, 89, 111-116.
39. Innis, M.A., and Miller, D.L. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 9148-9154.
40. Olsson, M., Lindahl, G., and Ruoslahti, E. (1977) *J. Exp. Med.*, 145, 819-827.
41. Belayew, A., and Tilghman, S.M. (1982) *Mol. Cell. Biol.*, 2, 1427-1435.
42. Vacher, J., Camper, S.A., Krumlauf, R., Compton, R.S., and Tilghman, S.M. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, 12, 856-864.
43. Vedel, M., Gomez-Garcia, M., Sala, M., and Sala-Trepat, J.M. (1983) *Nucl. Acids Res.*, 11, 4335-4354.
44. Turcotte, B., Guertin, M., Chevette, M., LaRue, H., and Belanger, L. (1986) *Nucl. Acids Res.*, 14, 9827-9841.
45. Opdecamp, K., Riviere, M., Molne, M., Szpirer, J., and Szpirer, C. (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20, 171-178.
46. Widen, S.G., and Papaconstantinou, J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8196-8200.
47. Guertin, M., LaRue, H., Bernier, D., Wrangle, O., Chevette, M., Gingras, M.C., and Belanger, L. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, 8, 1398-1407.
48. Godbout, R., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, 8, 1169-1178.
49. Wen, P., Group, E.R., Buzard, G., Crawford, N., and Locker, J. (1991) *DNA Cell Biol.*, 10, 525-536.
50. Camper, S.A., and Tilghman, S.M. (1989) *Genes Dev.*, 3, 537-546.
51. Vacher, J., and Tilghman, S.M. (1990) *Science*, 250, 1732-1735.
52. Hammer, R.E., Krumlauf, R., Camper, S.A., Brinster, R.L., and Tilghman, S.M. (1987) *Science*, 235, 53-58.
53. Chevette, M., Guertin, M., Turcotte, B., and Belanger, L. (1987) *Nucl. Acids Res.*, 15, 1338-1339.
54. Ryan, S.C., Zielinski, R., and Dugaiczky, A. (1991) *Genomics*, 9, 60-72.
55. Song, Y.H., Ray, K., Liebhaver, S.A., and Cooke, N.E. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 28408-28418.
56. Mathew, J.K., Knoll, B.J., Pilla, A., Durham, D., and Sell, S. (1994) *J. Tumor Marker Oncol.*, 9, 21-28.
57. Group, E.R., Crawford, N., and Locker, J. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 22178-22187.
58. Jin, J.R., Wen, P., and Locker, J. (1995) *DNA Cell Biol.*, 14, 267-272.
59. Camper, S.A., Godbout, R., and Tilghman, S.M. (1989) *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 36, 131-143.
60. Millionig, J.H., Emerson, J.A., Levorso, J.M., and Tilghman, S.M. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 15, 3848-3856.
61. Ramesh, T.M., Ellis, A.W., and Spear, B.T. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 15, 4947-4955.
62. Spear, B.T. (1999) *Semin. Cancer Biol.*, 9, 109-116.
63. Qiu, Y., Krishnan, V., Pereira, F.A., Tsai, S.Y., and Tsai, M.J. (1996) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 56, 81-85.
64. Thomassin, H., Bois-Joyeux, B., Delille, R., Ikonomova, R., and Danan, J.L. (1996) *DNA Cell Biol.*, 15, 1063-1074.
65. Nakabayashi, H., Hashimoto, T., Miyao, Y., Tjong, K.K., Chan, J., and Tamaoki, T. (1991) *Mol. Cell. Biol.*, 11, 5885-5893.



66. Emerson, J.A., Vacher, J., Cirillo, L.A., Tilghman, S.M., and Tyner, A.L. (1992) *Dev. Dyn.*, 195, 55-66.
67. Henriette, M.F., Gabant, P., Dreze, P.L., Szpirer, C., and Szpirer, J. (1997) *Folia Biol.*, 43, 5-13.
68. Powell, D.J., Friedman, J.M., Oulette, A.J., Krauter, K.S., and Darnell, J.E., Jr. (1984) *J. Mol. Biol.*, 179, 21-35.
69. Cereghini, S., Blumenfeld, M., and Yaniv, M. (1988) *Genes Dev.*, 2, 957-974.
70. De Simone, V., De Magistris, L., Lazzaro, D., Gestner, J., Monaci, P., Nicosia, A., and Cortese, R. (1991) *EMBO J.*, 5, 1435-1443.
71. Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M., and Cereghini, S. (1991) *EMBO J.*, 10, 1445-1457.
72. Wright, C.V.E. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3, 976-982.
73. Tronche, F., Ringeisen, F., Blumenfeld, M., Yaniv, M., and Pontoglio, M. (1997) *J. Mol. Biol.*, 266, 231-245.
74. Mendel, D.B., Hansen, L.P., Graves, M.K., Conley, P.B., and Crabtree, G.R. (1991) *Genes Dev.*, 5, 1042-1056.
75. Mendel, D.B., Khavari, P.A., Conley, P.B., Graves, M.K., Hansen, L.P., Admon, A., and Crabtree, G.R. (1991) *Science*, 254, 1762-1767.
76. Bach, I., and Yaniv, M. (1993) *EMBO J.*, 12, 4229-4242.
77. Ringeisen, F., Rey-Campos, J., and Yaniv, M. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 25706-25711.
78. Hansen, L.P., and Crabtree, G.R. (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 3, 246-253.
79. Tian, J.M., and Schibler, U. (1991) *Genes Dev.*, 5, 2225-2234.
80. Kuo, C.J., Conley, P.B., Chen, L., Sladek, F.M., Darnell J.E., Jr., and Crabtree, G.R. (1992) *Nature*, 355, 457-461.
81. Power, S.C., and Cereghini, S. (1996) *Mol. Cell Biol.*, 16, 778-791.
82. Cereghini, S., Ott, M.O., Power, S., and Maury, M. (1992) *Development*, 116, 783-797.
83. Cascio, S., and Zaret, K.S. (1991) *Development*, 113, 217-225.
84. Blumenfeld, M., Maury, M., Chouard, T., Yaniv, M., and Condamine, H. (1991) *Development*, 113, 589-599.
85. Ott, M.O., Rey-Campos, J., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1991) *Mech. Dev.*, 36, 47-58.
86. Baumhueter, S., Courtois, G., and Crabtree, G.R. (1988) *EMBO J.*, 7, 2485-2493.
87. Bulla, G.A., and Fournier, R.E. (1994) *Mol. Cell Biol.*, 14, 7086-7094.
88. Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J.P., Babinet, C., and Yaniv, M. (1996) *Cell*, 84, 575-585.
89. Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R.D., Lathrop, G.M., Boriraj, V.V., Chen, X., Cox, N.J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M.M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S.S., Hattersley, A.T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K.S., and Bell, G.I. (1996) *Nature*, 384, 455-458.
90. Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Cox, N.J., Fajans, S.S., Signorini, S., Stoffel, M., and Bell, G.I. (1996) *Nature*, 384, 458-460.
91. Guazzarotti, L., Bartolotta, E., and Chiarelli, F. (1999) *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 12, 487-497.
92. Pontoglio, M., Sreenan, S., Roe, M., Pugh, W., Ostrega, D., Doyen, A., Pick, A.J., Baldwin, A., Velho, G., Froguel, P., Levisetti, M., Bonner-Weir, S., Bell, G.I., Yaniv, M., and Polonsky, K.S. (1998) *J. Clin. Invest.*, 101, 2215-2222.
93. Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1988) *Science*, 240, 1759-1764.
94. Zaret, K.S. (1994) in *The Liver: Biology and Pathobiology*. (Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D.A., and Shafritz, D.A., eds), Raven Press, N.Y.
95. Croniger, C., Trus, M., Lysek-Stupp, K., Cohen, H., Liu, Y., Darlington, G.J., Poli, V., Hanson, R.W., and Reshef, L. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 26306-26312.
96. Thomassin, H., Hamel, D., Bernier, D., Guertin, M., and Belanger, L. (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20, 3091-3098.
97. Costa, R.H., Grayson, D.R., Xanthopoulos, K.G., and Darnell, J.E., Jr. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3840-3844.
98. Legerverend, C., Antonson, P., Flodby, P., and Xanthopoulos, K.G. (1993) *Nucl. Acids Res.*, 21, 1735-1742.
99. Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E., and Schibler, U. (1990) *Genes Dev.*, 4, 1541-1551.
100. Welm, A.L., Timchenko, N.A., and Darlington, G.J. (1999) *Mol. Cell Biol.*, 19, 1695-1704.
101. Xanthopoulos, K.G., and Mirkovitch, J. (1993) *Eur. J. Biochem.*, 216, 353-360.
102. Mueller, C.R., Maire, P., and Schibler, U. (1990) *Cell*, 61, 279-291.
103. Wuarin, J., Falvey, E., Lavery, D., Talbot, D., Schmidt, E., Ossipow, V., Fonjallaz, P., and Schibler, U. (1992) *J. Cell. Sci. Suppl.*, 16, 123-127.
104. Umek, R.M., Friedman, A.D., and McKnight, S.L. (1991) *Science*, 251, 288-292.
105. Samuelsson, L., Stromberg, K., Vikman, K., Bjursell, G., and Enerback, S. (1991) *EMBO J.*, 10, 3787-3793.
106. Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., and Darlington, G.J. (1995) *Science*, 269, 1108-1112.
107. Soriano, H.E., Kang, D.C., Finegold, M.J., Hicks, M.J., Wang, N.D., Harrison, W., and Darlington, G.J. (1998) *Hepatology*, 27, 392-401.
108. Zhang, D.E., Zhang, P., Wang, N.D., Hetherington, C.J., Darlington, G.J., and Tenen, D.G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 569-574.
109. Weigel, D., and Jackle, H. (1990) *Cell*, 63, 455-456.
110. Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E., and Burley, S.K. (1993) *Nature*, 364, 412-420.
111. Costa, R.H., Grayson, D.R., and Darnell J.E., Jr. (1989) *Mol. Cell Biol.*, 9, 1415-1425.
112. Lai, E., Prezioso, V.R., Smith, E., Litvin, O., Costa, R.H., and Darnell J.E., Jr. (1990) *Genes Dev.*, 4, 1427-1436.
113. Jackson, D.A., Rowader, K.E., Stevens, K., Jiang, C., Milos, P., and Zaret, K.S. (1993) *Mol. Cell Biol.*, 13, 2401-2410.
114. Pani, L., Quian, X.B., Clevidence, D., and Costa, R.H. (1992) *Mol. Cell Biol.*, 12, 552-562.
115. Ang, S.L., Wierda, A., Wong, D., Stevens, K.A., Cascio, S., Rossant, J., and Zaret, K.S. (1993) *Development*, 119, 1301-1315.
116. Kaestner, K.H., Hiemisch, H., Luckow, B., and Schutz, G. (1994) *Genomics*, 20, 377-385.
117. DiPersio, C.M., Jackson, D.A., and Zaret, K.S. (1991) *Mol. Cell Biol.*, 11, 4405-4414.
118. Weinstein, D.C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W.S., Hoodless, P., Prezioso, V.R., Jessell, T.M., and Darnell J.E., Jr. (1994) *Cell*, 78, 575-588.
119. Ang, S.L., and Rossant, J. (1994) *Cell*, 78, 561-574.
120. Sund, N., Katz, J., Liu, Y., Drucker, D., Schutz, G., Ang, S.-L., Magnuson, M., and Kaestner, K. (1999) in *Liver Development, Gene Regulation and Disease*, Orvieto, Italy, pp. 123.
121. Kaestner, K.H., Katz, J., Liu, Y., Drucker, D.J., and Schutz, G. (1999) *Genes Dev.*, 13, 495-504.
122. Kaestner, K.H., Hiemisch, H., and Schutz, G. (1998) *Mol. Cell Biol.*, 18, 4245-4251.
123. Sladek, F.M., Zhong, W.M., Lai, E., and Darnell J.E., Jr. (1990) *Genes Dev.*, 4, 2353-2365.

124. Holewa, B., Zapp, D., Drewes, T., Senkel, S., and Ryffel, G.U. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 687-694.
125. Zhong, W., Sladek, F.M., and Darnell J.E., Jr. (1993) *EMBO J.*, **12**, 537-544.
126. Holewa, B., Strandmann, E.P., Zapp, D., Lorenz, P., and Ryffel, G.U. (1996) *Mech. Dev.*, **54**, 45-57.
127. Ktistaki, E., and Talianidis, I. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2790-2797.
128. Green, V.J., Kokkotou, E., and Ladias, J.A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 29950-29957.
129. Wang, J.C., Stafford, J.M., and Granner, D.K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 30847-30850.
130. Sladek, F.M., Ruse, M.D., Jr., Nepomuceno, L., Huang, S.M., and Stallcup, M.R. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6509-6522.
131. Duncan, S.A., Manova, K., Chen, W.S., Hoodless, P., Weinstein, D.C., Bachvarova, R.F., and Darnell J.E., Jr. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7598-7602.
132. Taraviras, S., Monaghan, A.P., Schutz, G., and Kelsey, G. (1994) *Mech. Dev.*, **48**, 67-79.
133. Faust, D.M., Boshart, M., Imaizumi-Scherrer, T., Schutz, G., and Weiss, M.C. (1994) *Cell Growth. Differ.*, **5**, 47-53.
134. Spath, G.F., and Weiss, M.C. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1913-1922.
135. Spath, G.F., and Weiss, M.C. (1998) *J. Cell. Biol.*, **140**, 935-946.
136. Chen, W.S., Manova, K., Weinstein, D.C., Duncan, S.A., Plump, A.S., Prezioso, V.R., Bachvarova, R.F., and Darnell J.E., Jr. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 2466-2477.
137. Duncan, S.A., Nagy, A., and Chan, W. (1997) *Development*, **124**, 279-287.
138. Morrissey, E.E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M.M., Jiang, F., Ip, H.S., and Parmacek, M.S. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 3579-3590.
139. Coucouvanis, E., and Martin, G.R. (1999) *Development*, **126**, 535-546.
140. Nastos, A., Pogge von Strandmann, E., Weber, H., and Ryffel, G.U. (1998) *Nucl. Acids Res.*, **26**, 5602-5608.
141. Samadani, U., and Costa, R.H. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6273-6284.
142. Lemaigre, F.P., Durvieux, S.M., Truong, O., Lannoy, V.J., Hsuan, J.J., and Rousseau, G.G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9460-9464.
143. Landry, C., Clotman, F., Hioki, T., Oda, H., Picard, J.J., Lemaigre, F.P., and Rousseau, G.G. (1997) *Dev. Biol.*, **192**, 247-257.
144. Lahuna, O., Fernandez, L., Karlsson, H., Maiter, D., Lemaigre, F.P., Rousseau, G.G., Gustafsson, J., and Mode, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12309-12313.
145. Tonjes, R.R., Xanthopoulos, K.G., Darnell J.E., Jr., and Paul, D. (1992) *EMBO J.*, **11**, 127-133.
146. Kritis, A.A., Ktistaki, E., Barda, D., Zannis, V.I., and Talianidis, I. (1993) *Nucl. Acids Res.*, **21**, 5882-5889.
147. Zhong, W., Mirkovitch, J., and Darnell J.E., Jr. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7276-7284.
148. Duncan, S.A., Navas, M.A., Dufort, D., Rossant, J., and Stoffel, M. (1998) *Science*, **281**, 692-695.
149. Feuerman, M.H., Godbout, R., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 4204-4212.
150. Tronche, F., and Yaniv, M. (1992) *BioEssays*, **14**, 579-587.
151. Bois-Joyeux, B., and Danan, J.L. (1994) *Biochem. J.*, **301** (Pt 1), 49-55.
152. Morinaga, T., Yasuda, H., Hashimoto, T., Higashio, K., and Tamaoki, T. (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 6041-6049.
153. Yasuda, H., Mizuno, A., Tamaoki, T., and Morinaga, T. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1395-1401.
154. Bernier, D., Thomassin, H., Allard, D., Guertin, M., Hamel, D., Blaquiere, M., Beauchemin, M., LaRue, H., Estable-Puig, M., and Belanger, L. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1619-1633.
155. Galarneau, L., Pare, J.F., Allard, D., Hamel, D., Levesque, L., Tugwood, J.D., Green, S., and Belanger, L. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3853-3865.
156. Buzard, G., and Locker, J. (1990) *DNA Seq.*, **1**, 33-48.
157. Wen, P., and Locker, J. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6616-6626.
158. Wen, P., Crawford, N., and Locker, J. (1993) *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1911-1918.
159. Apergis, G.A., Crawford, N., Ghosh, D., Steppan, C.M., Vorachek, W.R., Wen, P., and Locker, J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2917-2925.
160. Turcotte, B., Guertin, M., Chevrete, M., and Belanger, L. (1985) *Nucl. Acids Res.*, **13**, 2387-2398.
161. Dong, J.M., Nordloh, P.W., and Chiu, J.F. (1989) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **66**, 109-114.
162. Zhang, X.K., Dong, J.M., and Chiu, J.F. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 8248-8254.
163. Hogan, B.L., Taylor, A., and Adamson, E. (1981) *Nature*, **291**, 235-237.
164. Wan, Y.J., and Wu, T.C. (1992) *Differentiation*, **50**, 107-111.
165. Liu, Y., and Chiu, J.F. (1994) *Nucl. Acids Res.*, **22**, 1079-1086.
166. Varga, E.V., Kustova, I.F., and Lazarevich, N.L. (1999) *Mol. Biol.*, **33**, 273-281.
167. Yamada, Y., Shidoji, Y., Fukutomi, Y., Ishikawa, T., Kaneko, T., Nakagama, H., Imawari, M., Moriwaki, H., and Muto, Y. (1994) *Mol. Carcinog.*, **10**, 151-158.
168. Ikeda, H., and Fujiwara, K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 675-680.
169. Chen, H., Egan, J.O., and Chiu, J.F. (1997) *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Exp.*, **7**, 11-41.
170. Saegusa, M., Ido, A., Nakabayashi, H., Sakai, M., and Tamaoki, T. (1994) *J. Tumor Marker Oncol.*, **9**, 29-34.
171. Tournier-Thurneyssen, I., Feldmann, G., and Bernuau, D. (1993) *Tumour Biol.*, **14**, 201-212.
172. Tournier-Thurneyssen, I., Feldmann, G., and Bernuau, D. (1992) *Biol. Cell.*, **75**, 61-68.
173. Chen, J.-Y., Penco, S., Ostrowski, J., Balaguer, P., Pons, M., Starrett, J.E., Reczek, P., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1995) *EMBO J.*, **14**, 1187-1197.
174. Lee, K.C., Crowe, A.J., and Barton, M.C. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1279-1288.
175. Pachnis, V., Belayew, A., and Tilghman, S.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5523-5527.
176. Blankenhorn, E.P., Duncan, R., Huppi, K., and Potter, M. (1988) *Genetics*, **119**, 687-691.
177. Vogt, T.F., Solter, D., and Tilghman, S.M. (1987) *Science*, **236**, 301-303.
178. Jin, D.K., and Feuerman, M.H. (1998) *Mamm. Genome.*, **9**, 256-258.
179. Spear, B.T. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6497-6505.
180. Jin, D.K., Vacher, J., and Feuerman, M.H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8767-8772.
181. Eraiser, T.L., Yazova, A.K., Poltoranina, V.S., Kuprina, N.I., Karamova, E.R., Shipova, L.Y., Lazarevich, N.L., and Abelev, G.I. (1998) *Int. J. Cancer.*, **75**, 371-378.
182. McVey, J.H., Michaelides, K., Hansen, L.P., Ferguson-Smith, M., Tilghman, S., Krumlauf, R., and Tuddenham, E.G. (1993) *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 379-384.
183. Gleiberman, A.S., Kudrjavitseva, E.I., Sharovskaya, Y.U.U., and Abelev, G.I. (1989) *Mol. Biol. Med.*, **6**, 95-107.